



**TUGAS AKHIR - SB141510**

**METODE RAPD SEBAGAI MARKA MOLEKULER  
TANAMAN JAGUNG (*Zea mays* L.) TAHAN  
CEKAMAN SALINITAS**

**SITI DIANAWATI  
1512100057**

**Dosen Pembimbing:  
Triono Bagus Saputro, S.Si., M.Biotech.**

**JURUSAN BIOLOGI  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember  
Surabaya 2016**



**FINAL PROJECT - SB141510**

***RAPD METHOD AS A MOLECULAR MARKER IN  
SALT TOLERANCE MAIZE (Zea mays L.)***

**SITI DIANAWATI  
1512100057**

**Supervisor:  
Triono Bagus Saputro, S.Si., M.Biotech.**

**DEPARTMENT OF BIOLOGY  
Mathematics and Natural Science Faculty  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember  
Surabaya 2016**

## LEMBAR PENGESAHAN

### METODE RAPD SEBAGAI MARKA MOLEKULER TANAMAN JAGUNG (*Zea mays* L.) TAHAN CEKAMAN SALINITAS

#### TUGASAKHIR

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains  
pada  
Jurusan S-1 Biologi  
Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

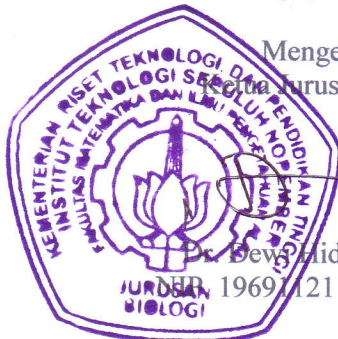
Oleh:

**SITI DIANAWATI**  
**NRP. 1512 100 057**


**Disetujui oleh pembimbing Tugas Akhir :**

Triono Bagus Saputro, S.Si., M.Biotech.  (Pembimbing)

**Surabaya, 28 Juli 2016**



Mengetahui  
Ketua Jurusan Biologi

  
Dr. Dewi Hidayati, M.Si.  
NRP. 19691121 199802 2 001

# **METODE RAPD SEBAGAI MARKA MOLEKULER TANAMAN JAGUNG (*Zea mays* L.) TAHAN CEKAMAN SALINITAS**

**Nama Mahasiswa** : Siti Dianawati  
**NRP** : 1511 100 057  
**Jurusan** : Biologi  
**Dosen Pembimbing** : Triono Bagus Saputro, S.Si.,  
M.Biotech.

## **Abstrak**

*Jagung (*Zea mays* L.) merupakan komoditas pangan strategis dan bernilai ekonomis tinggi serta mempunyai peluang untuk dikembangkan karena kedudukannya sebagai sumber utama karbohidrat dan protein setelah beras. Permintaan jagung yang terus meningkat dari tahun ke tahun tidak linear dengan peningkatan produksi tanaman jagung dikarenakan adanya alih fungsi lahan sehingga, diperlukan area baru yaitu dengan memanfaatkan lahan marginal seperti lahan salin di pesisir. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat ketahanan dan pengaruh cekaman salinitas pada jagung varietas Bluto dan Manding serta keragaman genetik galur hasil seleksi in vitro.*

*Pada penelitian ini, untuk mendapatkan varietas *Z. mays* yang toleran terhadap salinitas dilakukan dengan menggunakan teknik in vitro. Pertama dilakukan induksi kalus (MS0 + 2,4-D 3 ppm), kemudian kalus disubkultur pada medium seleksi (MS0 + 2,4-D 3 ppm + NaCl (0, 2500, 5000, dan 7500 ppm)). Selanjutnya dilakukan analisis RAPD untuk melihat keragaman genetik.*

*Hasil penelitian menunjukkan bahwa varietas Manding memiliki tingkat ketahanan yang lebih tinggi terhadap cekaman salinitas dibandingkan dengan varietas Bluto. Salinitas tinggi berpengaruh terhadap perubahan morfologi kalus, persentase kalus hidup dan pertumbuhan kalus. Hasil analisis RAPD menunjukkan polimorfisme pita DNA yang teramplifikasi oleh*

*primer OPA 10, OPB 07, dan OPC 02. Polimorfisme menandakan bahwa kalus hasil seleksi in vitro memiliki keragaman genetik.*

*Kata kunci: cekaman salinitas, RAPD, polimorfisme, seleksi in vitro, Zea mays L.*

## **RAPD METHOD AS A MOLECULAR MARKER IN SALT TOLERANCE MAIZE (*Zea mays* L.)**

**Student Name** : Siti Dianawati  
**NRP** : 1511 100 057  
**Departement** : Biologi  
**Supervisor** : Triono Bagus Saputro, S.Si.,  
M.Biotech.

### **Abstract**

Maize (*Zea mays* L.) is a strategic food commodities and has a high economic value as well as have the opportunity to be developed due to its fuction as the main source of carbohydrates and protein after rice. The demand of maize continues to increase years to come and this condition is not linear with the production level due to land conversion. So that needed a new area for the production of maize that is by utilizing marginal land as saline coastal land. The aims of this study is to investigate the level of resistance and the effect of salinity on Maize varieties i.e Bluto and Manding and also the genetic diversity of somaclon resulted from in vitro selection.

In this study, in vitro selection will be applied to obtain high salt tolerance varieties of *Z. mays*. First, callus induction will be conducted by using medium with composition MS0 + 2,4-D 3ppm, then subcultured onto selection medium with the composition MS0 + 2,4-D 3 ppm + NaCl (0, 2500, 5000, and 7500 ppm). Furthermore, RAPD analysis is used to see genetic diversity.

The results showed that Manding varieties have higher levels of resistance to salinity stress compared with Bluto varieties. High salinity affect the morphological changes of callus, callus percentage survival and growth of callus. The results of RAPD analysis showed polymorphism DNA are amplified by the primer OPA 10, OPB 07 and OPC 02. Polymorphism indicates that the callus is the result of in vitro selection has a genetic diversity.

Keywords: in vitro selection, Polymorphism, RAPD, salinity, *Zea mays* L.

# DAFTAR ISI

Halaman

LEMBAR PENGESAHAN .....	iii
ABSTRAK.....	iv
ABSTRACT.....	vi
KATA PENGANTAR .....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
 BAB I PENDAHULUAN .....	 1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Batasan Masalah .....	4
1.4 Tujuan.....	4
1.5 Manfaat.....	4
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	 7
2.1 Jagung ( <i>Zea mays</i> L.).....	7
2.1.1 Klasifikasi Tanaman Jagung ( <i>Zea mays</i> L.).....	7
2.1.2 Distribusi dan Syarat Tumbuh Tanaman Jagung ( <i>Zea mays</i> L.).....	8
2.1.3 Morfologi dan Penggolongan Tanaman Jagung ( <i>Zea mays</i> L.).....	9
2.1.4 Karakteristik Varietas Jagung ( <i>Zea may</i> L.) .....	15
2.1.5 Manfaat Jagung.....	16
2.2 Cekaman Salinitas dan Respon Tanaman terhadap Cekaman Salinitas .....	18
2.3 Seleksi <i>In vitro</i> dan Induksi Variasi.....	21
2.4 <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (RAPD).....	24



BAB III METODOLOGI .....	27
3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian.....	27
3.2 Alat dan Bahan .....	27
3.2.1 Alat.....	27
3.2.2 Bahan.....	27
3.3 Metode yang Digunakan .....	28
3.3.1 Tahap Persiapan .....	28
3.3.2 Tahap Penelitian.....	30
3.3.3 Tahap Pengamatan Parameter .....	34
3.4 Rancangan Penelitian .....	35
3.5 Analisis Data .....	37
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	 39
4.1 Pengaruh Cekaman Salinitas (NaCl) terhadap Morfologi Kalus .....	 39
4.2 Pengaruh Cekaman Salinitas (NaCl) terhadap Persentase Kalus Hidup.....	 47
4.3 Pengaruh Cekaman Salinitas (NaCl) terhadap Pertumbuhan Kalus .....	 49
4.4 Analisis RAPD .....	52
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....	 61
5.1 Kesimpulan .....	61
5.2 Saran.....	61
 DAFTAR PUSTAKA.....	 63
LAMPIRAN .....	77
BIODATA PENULIS.....	83

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1    Unsur Pangan Fungsional pada Jagung .....	17
Tabel 3.2    Reagen untuk proses PCR.....	32
Tabel 3.3    Daftar primer dan urutan basa nitrogen yang digunakan untuk analisis RAPD .....	32
Tabel 3.4    Pengamatan persentase kalus hidup pada seleksi <i>in vitro</i> .....	35
Tabel 3.5    Pengamatan pertumbuhan relatif kalus pada seleksi <i>in vitro</i> .....	36
Tabel 3.6    Pengamatan hasil analisis RAPD .....	36
Tabel 4.7    Morfologi Kalus Bluto Sebelum dan Sesudah di Cekam NaCl .....	41
Tabel 4.8    Morfologi Kalus Manding Sebelum dan Sesudah di Cekam NaCl .....	42
Tabel 4.9    Presentase Kalus Hidup pada Seleksi <i>In Vitro</i> selama 28 hari .....	47
Tabel 4.10   Pertambahan Kalus Jagung Varietas Bluto pada Kontrol dan Perlakuan NaCl .....	51
Tabel 4. 11   Hasil Analisis RAPD Kalus Jagung Varietas Bluto .....	55

Tabel 4.12	Hasil Analisis RAPD Kalus Jagung Varietas	
	Manding .....	56

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Tanaman Jagung.....	7
Gambar 2.2 Sudut Daun Jagung. ....	11
Gambar 2.3 Bentuk Ujung Daun Jagung. ....	11
Gambar 2.4 Bunga Jagung. ....	12
Gambar 2.5 Biji Jagung dan Bagian – Bagiannya .....	12
Gambar 2.6 Jagung Varietas Bluto .....	15
Gambar 2.7 Jagung Varietas Manding.....	16
Gambar 3.8 Tahap Proses Ekstraksi DNA.....	33
Gambar 3.9 Tahap Proses PCR.....	34
Gambar 4.10 Morfologi kalus Bluto .....	43
Gambar 4.11 Morfologi Manding.....	44
Gambar 4.12 Proses Degradasi Klorofil. ....	46
Gambar 4.13 Visualisasi pita DNA varietas Bluto. ....	54
Gambar 4.14 Visualisasi pita DNA varietas Manding.....	54

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Pertambahan Berat Kalus Bluto .....	77
Lampiran 2 Pertambahan Berat Kalus Manding.....	78
Lampiran 3 Hasil uji ANOVA kalus jagung varietas Bluto.....	79
Lampiran 4 Hasil uji ANOVA kalus jagung varietas Manding .....	79
Lampiran 5 Alur penelitian .....	80
Lampiran 6 DNA Ladder, Geneaid 1 kb.....	81

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Jagung (*Zea mays* L.) merupakan salah satu tanaman serealia penting di dunia setelah gandum dan padi (Sudharani *et al.*, 2012). Di Indonesia, jagung merupakan komoditas pangan strategis dan bernilai ekonomis serta mempunyai peluang untuk dikembangkan karena kedudukannya sebagai sumber utama karbohidrat dan protein setelah beras (Katriani, 2013). Jagung dimanfaatkan sebagai makanan pokok, lauk – pauk, makanan selingan, dan bahan setengah jadi yang dihasilkan oleh beragam jenis industri dan skala usaha. Selain sebagai bahan pangan, jagung juga dimanfaatkan sebagai bahan baku utama dalam pembuatan pakan ternak (Susbandi *dalam* Winarso, 2012; Ariani & Pasandaran, 2002; Tangendjaja *et al.*, 2002).

Permintaan jagung terus meningkat dari tahun ke tahun sejalan dengan meningkatnya jumlah penduduk dan industri (Katriani, 2013). Diproyeksikan permintaan jagung pada tahun 2010 – 2050 cenderung meningkat sebesar 0,68% per tahun (Sudaryanto *et al.*, 2010). Peningkatan kebutuhan ini tidak linear dengan peningkatan produksi tanaman jagung dikarenakan adanya alih fungsi lahan dari lahan subur menjadi pemukiman, industri dan perluasan sarana serta prasarana (Amanah *et al.*, 2008). Sehingga diperlukan area baru untuk produksi tanaman jagung yaitu dengan memanfaatkan lahan marginal.

Lahan marginal adalah lahan yang berpotensi rendah untuk menghasilkan produksi pangan karena memiliki sifat fisik, kimia, dan mineral tidak menguntungkan dan juga pengaruh lingkungan seperti iklim, hidrologi, dan topografi yang tidak mendukung pertumbuhan tanaman (Surahman *et al.*, 2008). Salah satu contoh lahan marginal adalah lahan salin disekitar pantai. Sebagai negara kepulauan yang berjumlah 17.508 pulau, Indonesia mempunyai wilayah pantai yang luas (Gunadi, 2002). Menurut Badan Informasi Geospasial (BIG), Indonesia memiliki total panjang garis pantai sebesar 99.093 Km (Samantha, 2013). Berdasarkan

fakta ini, maka sangat mungkin bagi Indonesia untuk memperluas area pertanian dengan memanfaatkan kawasan pesisir. Namun, pemanfaatan kawasan pesisir sebagai lahan pertanian memiliki keterbatasan yaitu salinitas yang tinggi.

Salinitas merupakan stres abiotik yang menjadi faktor pembatas utama bagi produktivitas tanaman di dunia (Karmoker *et al.*, 2008; Flower *dalam* Bakht *et al.*, 2011). Cekaman salinitas dapat mengganggu pertumbuhan tanaman, aktivitas fisiologi dan biokimia seperti fotosintesis dan kandungan klorofil (Hajer *et al.*, 2006; Saleh, 2012). Klorofil daun pada tanaman yang berada dalam kondisi cekaman salinitas akan mengalami kerusakan sehingga dapat menurunkan aktivitas fotosintesis (Turan *dalam* Rohanipoor *et al.*, 2013).

Jagung merupakan tanaman C4 yang juga dikelompokkan kedalam tanaman yang sensitif – moderat sensitif terhadap cekaman salinitas (Ouda *et al.*, 2008). Oleh karena itu, perlu dikembangkan tanaman jagung yang tahan terhadap cekaman salinitas, salah satunya adalah dengan melakukan seleksi *in vitro* ketahanan jagung terhadap kondisi salinitas tinggi. Tanaman yang diperbanyak melalui kultur *in vitro* dapat menyebabkan variasi somaklonal yang tinggi pada setiap planletnya. Hasil somaklon memiliki keragaman genetik yang tinggi (Larkin & Scowcroft *dalam* Hutami *et al.*, 2006).

Varietas jagung yang digunakan dalam penelitian ini adalah jagung varietas Bluto dan Manding. Kedua varietas jagung ini merupakan varietas jagung lokal Indonesia yang memiliki pola penyerbukan terbuka. Jagung dengan pola penyerbukan terbuka memiliki keunggulan dibandingkan dengan jagung lain misalnya, jagung hibrida, yaitu, tidak mengalami segregasi sehingga anakan jagung (F2) memiliki sifat yang sama dengan tetuanya. Oleh karena itu, biji jagung hasil panen (F2) dapat digunakan untuk penanaman selanjutnya (dua atau tiga kali musim tanam jagung) tanpa berakibat pada menurunnya hasil panen. Hal ini dapat menghemat biaya pembelian benih jagung. Sebaliknya, pemanfaatan biji hasil panen (F2) jagung hibrida akan berdampak

pada menurunnya hasil panen karena jagung hibrida mengalami segregasi sehingga sifat anaknya (F2) beragam atau tidak sama dengan tetuanya. Oleh karena itu, petani harus membeli biji jagung bersertifikat setiap kali akan menanam jagung (Mhike, 2004). Jagung varietas Bluto dan Manding merupakan jagung lokal asal Madura. Kedua varietas tersebut merupakan varietas unggulan daerah tersebut. Jagung lokal sangat diminati terutama untuk bahan pangan karena lebih tahan lama ketika disimpan. Namun, hasil panennya sedikit.

Penerapan teknologi marka molekuler utamanya untuk memonitor variasi susunan DNA di dalam spesies tanaman (Pabendon, 2004). Untuk mengetahui keragaman genetik jagung yang diseleksi secara *in vitro* dengan tetuanya dapat dilakukan dengan bantuan marka molekuler (Latief & Amien, 2014). Pemilihan marka molekuler RAPD pada penelitian ini karena RAPD bersifat lebih sederhana, mudah dilakukan, cepat memberikan hasil, menghasilkan polimorfisme pita DNA dalam jumlah banyak dan mudah memperoleh primer acak yang diperlukan untuk menganalisis genom semua jenis organisme (Bardacki dalam Pharmawati, 2009; Langga *et al.*, 2012). Hal ini karena teknik RAPD tidak memerlukan informasi awal mengenai urutan DNA genom organisme yang diuji dan tidak memerlukan probe DNA yang spesifik (Pharmawati, 2009).

Penelitian ini penting dilakukan untuk menginduksi ketahanan tanaman jagung varietas Bluto dan Manding terhadap cekaman salinitas, serta mengetahui perubahan karakter genetik pada somaklon atau varian yang didapat.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Rumusan masalah yang dibahas dalam penelitian metode RAPD sebagai marka molekuler tanaman jagung (*Zea mays* L.) tahan cekaman salinitas yaitu:

1. Bagaimana tingkat ketahanan varietas Bluto dan Manding pada kondisi salinitas tinggi.
2. Bagaimana pengaruh cekaman salinitas terhadap pertumbuhan kalus jagung (*Zea mays* L.).



3. Bagaimana keragaman genetik galur hasil seleksi *in vitro*.

### **1.3 Batasan Masalah**

Batasan masalah yang dibahas dalam penelitian metode RAPD sebagai marka molekuler tanaman jagung (*Zea mays* L.) tahan cekaman salinitas yaitu:

1. Eksplan yang digunakan pada penelitian ini adalah tanaman *Z. mays* varietas Bluto dan Manding.
2. Media dasar yang digunakan untuk induksi kalus adalah media MS dengan konsentrasi ZPT 3 ppm 2,4-D
3. Pemberian cekaman salinitas dilakukan pada saat kalus telah berhasil diinduksi.
4. Primer yang digunakan dalam analisis RAPD terlihat pada tabel 3.3

### **1.4 Tujuan**

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian metode RAPD sebagai marka molekuler tanaman jagung (*Zea mays* L.) tahan cekaman salinitas yaitu:

1. Mengetahui tingkat ketahanan varietas Bluto dan Manding pada kondisi salinitas tinggi.
2. Mengetahui pengaruh cekaman salinitas terhadap pertumbuhan kalus jagung (*Zea mays* L.).
3. Mengetahui keragaman genetik galur hasil seleksi *in vitro*

### **1.5 Manfaat**

Manfaat dari penelitian metode RAPD sebagai marka molekuler tanaman jagung (*Zea mays* L.) tahan cekaman salinitas yaitu:

1. Memberikan informasi tentang pengaruh kondisi yang bersalinitas tinggi terhadap pertumbuhan tanaman jagung (*Zea mays* L.).
2. Galur hasil seleksi dapat digunakan secara lebih lanjut dalam perakitan varietas tahan salinitas yakni sebagai tetua persilangan.

3. Memberikan informasi yang dapat dimanfaatkan sebagai hasil antara untuk penelitian pengembangan marka molekuler pada tanaman jagung lokal Indonesia dengan teknik RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*).

**“Halaman Ini Sengaja Dikosongkan”**

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Jagung (*Zea mays* L.)**

##### **2.1.1 Klasifikasi Tanaman Jagung (*Zea mays* L.)**

Tanaman jagung merupakan tanaman tingkat tinggi dengan sistem metabolisme C4. Gambar 2.1 menunjukkan morfologi tanaman jagung.



Gambar 2.1 Tanaman Jagung (*Zea mays* L.).

Klasifikasi tanaman jagung menurut Rukmana (2000) adalah:

Regnum	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Classis	: Monocotyledoneae
Ordo	: Graminae
Familia	: Graminaceae
Genus	: <i>Zea</i>
Species	: <i>Zea mays</i>

### 2.1.2 Distribusi dan Syarat Tumbuh Tanaman Jagung (*Zea mays* L.)

Tanaman jagung (*Zea mays* L.) berasal dari Amerika, kemungkinan dari dataran tinggi Meksiko. Tanaman jagung mulai tersebar keseluruh dunia setelah orang – orang Eropa menemukan benua Amerika pada abad ke- 15. Tanaman jagung dapat ditemukan terutama di daerah beriklim sedang (Paliwal, 2000; Farnham, 2003).

Jagung merupakan tanaman serealia yang paling produktif di dunia, sesuai ditanam di wilayah bersuhu tinggi. Penyebaran tanaman jagung sangat luas karena mampu beradaptasi pada berabagai lingkungan. Jagung tumbuh baik di wilayah tropis hingga 50<sup>0</sup> LU dan 50<sup>0</sup> LS, dari dataran rendah sampai ketinggian 3.000 m diatas permukaan laut (dpl), dengan curah hujan tinggi, sedang, hingga rendah sekitar 500 mm per tahun (Dowswell *dalam* Katriani, 2013). Jagung dapat tumbuh optimal pada tanah yang gembur, drainase baik, dengan kelembapan tanah cukup. Tanaman jagung akan layu bila kelembapan tanah kurang dari 40% kapasitas lapang, atau bila batangnya terendam air. Pada dataran rendah, umur jagung berkisar antara 3 – 4 bulan, tetapi ditaran tinggi di atas 1000 m dpl berumur 4 – 5 bulan. Umur panen jagung sangat dipengaruhi oleh suhu karena pematangan tongkol ditentukan oleh akumulasi panas yang diperoleh tanaman. Setiap kenaikan tinggi tempat 50 m dpl, umur panen jagung mundur satu hari (Hyene *dalam* Katriani, 2013).

Areal dan agroekologi pertanaman jagung sangat bervariasi, dari dataran rendah sampai dataran tinggi, pada berbagai jenis tanah, berbagai tipe iklim dan bermacam pola tanam. Suhu optimum untuk pertumbuhan jagung rata – rata 26 – 30<sup>0</sup>C dan PH tanah 5,7 – 6,8 (Subandi *et al.*, 1998). Sedangkan menurut Zubachtirodin *et al.*, (2007) jagung dapat ditanam pada lahan pasang surut, lahan kering, lahan sawah, dan lebak, dengan berbagai jenis tanah, pada berbagai tipe iklim dan pada ketinggian tempat 0 – 2000 m dpl.

Faktor - faktor iklim yang penting untuk pertumbuhan jagung adalah jumlah dan distribusi sinar matahari, curah hujan, temperatur, kelembapan dan angin. Daerah penanaman jagung harus mendapat sinar matahari yang cukup dan tidak terlindung dari pohon dan bangunan. Pada saat menjelang berbunga dan saat tumbuhnya biji, tanaman jagung sangat membutuhkan air, sehingga diperlukan distribusi air yang merata selama pertumbuhan. Tanaman jagung membutuhkan air sekitar 100 - 140 mm/bulan. Oleh karena itu, waktu penanaman harus memperhatikan curah hujan dan penyebarannya. Penanaman dimulai bila curah hujan sudah mencapai 100 mm/bulan (Murni & Ratna, 2008).

### **2.1.3 Morfologi dan Penggolongan Tanaman Jagung (*Zea mays* L.)**

Tanaman jagung memiliki sistem perakaran serabut. Tanaman ini memiliki tiga macam akar yaitu akar seminal, akar adventif dan akar kait atau penyangga. Akar seminal merupakan akar yang berkembang dari radikula dan embrio. Pertumbuhan akar ini melambat setelah plumula muncul ke permukaan tanah dan akan berhenti tumbuh ketika jagung memasuki fase V 3 (ketika jumlah daun yang terbuka sempurna berjumlah 3). Akar seminal memiliki peran yang sedikit dalam siklus pertumbuhan jagung (Subekti *et al.*, 2008). Akar adventif merupakan akar yang tumbuh relatif dangkal dengan percabangan sangat lebat dan berfungsi sebagai penyerap air dan zat hara pada tanaman (Purwono & Hartono, 2008; Subekti *et al.*, 2008). Akar adventif tumbuh dari buku batang jagung (antara 7 – 10 buku), semuanya dibawah permukaan tanah. Akar ini akan berkembang menjadi serabut akar yang tebal. Akar kait atau penyangga tumbuh diatas permukaan tanah (Rubatzky & Yamaguchi, 1998). Akar kait atau penyangga merupakan akar adventif yang tumbuh pada dua atau tiga buku diatas tanah. Fungsi dari akar penyangga adalah menjaga agar tanaman tetap tegak dan mencegah rebah batang. Akar ini juga berperan dalam penyerapan air dan unsur hara (Subekti *et al.*, 2008). Perkembangan akar *Z. mays* (kedalaman

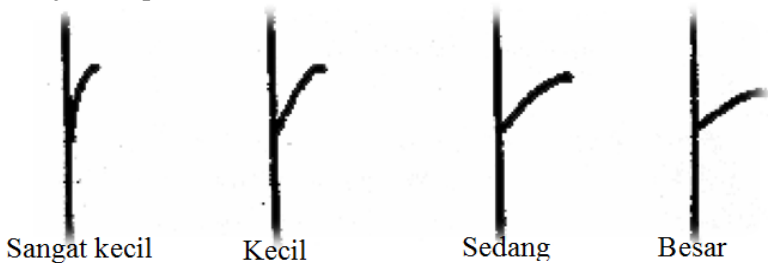
dan penyebarannya) bergantung pada varietas, pengolahan tanah, fisik dan kimia tanah, keadaan air tanah, dan pemupukan (Smith *dalam* Subekti *et al.*, 2008).

Batang tanaman jagung tidak bercabang, berbentuk silindris dan terdiri atas sejumlah ruas dan buku ruas. Tongkol jagung berkembang dari tunas yang terdapat pada buku ruas. Tongkol yang produktif berkembang dari dua tunas teratas. Batang memiliki tiga komponen jaringan utama yaitu epidermis (kulit), jaringan pembuluh dan *pith* (pusat batang). Jaringan pembuluh banyak terdapat pada lingkaran konsentris yang menuju perikarp disekitar epidermis dan mulai berkurang ketika mendekati pusat batang. Hal ini menyebabkan batang tahan rebah. Batang yang kuat memiliki lebih banyak lapisan sklerenkim berdinding tebal di bawah epidermis batang dan sekeliling jaringan pembuluh (Paliwal, 2000).

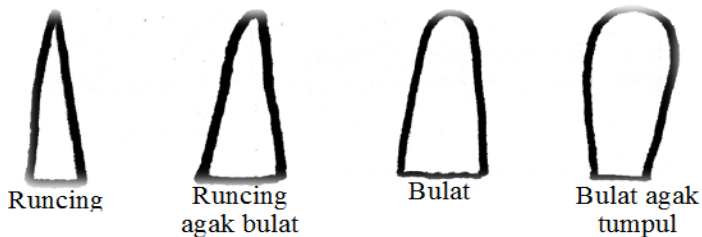
Tanaman jagung di daerah tropis memiliki daun yang relatif lebih banyak dibandingkan pada daerah beriklim sedang (*temperate*). Jumlah daun sesuai dengan jumlah buku batang, umumnya berkisar 10 – 18 helai. Daun jagung mulai terbuka setelah koleoptil muncul diatas tanah. Rata – rata munculnya daun yang terbuka sempurna adalah 3 - 4 hari setiap daun (Paliwal, 2000). Daun jagung terdiri atas helaian daun, ligula dan pelepah daun yang melekat erat pada batang jagung. Lebar helai beragam, mulai dari sangat sempit (< 5 cm), sempit (5,1 – 7 cm), sedang (7,1 – 9 cm), lebar (8,1 – 11 cm) dan sangat lebar (> 11 cm). Besar sudut daun juga beragam, hal ini mempengaruhi tipe daun jagung. Berdasarkan sudut daun, terdapat dua tipe daun jagung yaitu tegak (*erect*) dan menggantung (*pendant*) (Subekti *et al.*, 2008).

Daun jagung dengan tipe *erect* memiliki sudut antara kecil hingga sedang, pola helai daun bisa lurus atau bengkok dan memiliki kanopi yang kecil sehingga dapat ditanam dengan populasi yang tinggi. Daun jagung dengan tipe *pendant* umumnya memiliki sudut yang lebar dan pola daun bervariasi dari lurus hingga sangat bengkok. Selain sudut daun jagung yang beragam,

bentuk ujung daun juga beragam yaitu runcing, runcing agak bulat, bulat, bulat agak tumpul dan tumpul (Subekti *et al.* 2008). Besarnya sudut daun dan bentuk daun pada tanaman jagung ditunjukkan pada Gambar 2.2 dan 2.3.



Gambar 2.2 Sudut Daun Jagung (Subekti *et al.*, 2008).



Gambar 2.3 Bentuk Ujung Daun Jagung (Subekti *et al.*, 2008).

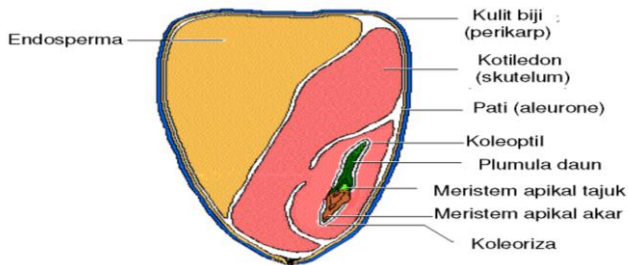
Jagung merupakan tanaman berumah satu (monoecious) karena bunga jantan dan betinanya terdapat dalam satu tanaman. Bunga betina (tongkol) muncul dari *axillary* tajuk, sedangkan bunga jantan (*tassel*) berkembang dari titik tumbuh apikal diujung tanaman (Paliwal, 2000). Rambut jagung (*silk*) adalah pemanjangan dari saluran *stilar ovary* yang matang pada tongkol. Panjangnya bergantung pada panjang tongkol dan kelobot, biasanya sekitar 30.5 cm atau lebih hingga keluar dari ujung kelobot (Subekti *et al.*, 2008). Gambar 2.4 menunjukkan morfologi bunga tanaman jagung.





Gambar 2.4 Bunga Jagung: Kiri, bunga jantan (anther dan spikelet) dan kanan, bunga betina (silk) (Subekti *et al.*, 2008).

Tanaman jagung memiliki satu atau dua tongkol (bergantung pada varietas) yang diselimuti kelobot. Umumnya, tongkol yang terletak dibagian atas lebih dulu terbentuk dan lebih besar dibandingkan dengan tongkol yang berada dibawah. Setiap tongkol terdiri dari 10 – 16 baris biji yang jumlahnya selalu genap (Subekti *et al.*, 2008). Biji jagung disebut kariopsis karena dinding ovari atau perikarp menyatu dengan kulit biji atau testa, membentuk dinding buah. Biji jagung (Gambar 2.5) terdiri atas 3 bagian utama yaitu, pericarp, endosperm dan embrio (Hardman & Gunsolus, 1998).



Gambar 2.5 Biji Jagung dan Bagian – Bagiannya (Subekti *et al.*, 2008).

Pericarp merupakan lapisan luar biji yang tipis, berfungsi melindungi embrio dari organisme pengganggu dan mencegah kehilangan air. Endosperm berfungsi sebagai cadangan makanan, mencapai 75% dari bobot biji yang mengandung 90% pati dan

10% protein, mineral, minyak dll. Embrio merupakan miniatur tanaman yang terdiri dari plumulae, akar radikal, skutelum dan koleoptil (Hardman & Gunsolus, 1998).

Berdasarkan bentuk dan struktur biji, biji jagung dikelompokkan sebagai berikut (Darrah *et al.*, 2003; Subekti *et al.*, 2008):

1. *Flint mize (Zea mays indurata)*, dicirikan dengan presentase endosperm keras lebih tinggi dan mengelilingi endosperm lunak yang terletak di tengah. Jagung tipe ini banyak digunakan sebagai makanan. Di Indonesia, tipe jagung ini dikenal sebagai jagung mutiara yang merupakan varietas umum jagung lokal Indonesia. Biji jagung tipe mutiara berbentuk bulat licin, mengkilap, dan keras. Bagian pati yang keras terletak dibagian atas biji.
2. *Dent mize (Zea mays indentata)* umumnya dimanfaatkan sebagai pakan ternak. Jagung tipe ini dicirikan dengan endosperm keras berada di bagian atas dan samping biji, sedangkan endosperm lunak berada pada bagian tengah sampai ujung biji. Pada waktu biji mengering, endosperm lunak kehilangan air lebih cepat dan lebih mengkerut dibandingkan dengan endosperm keras, sehingga terbentuk lekukan (*dent*) pada bagian atas biji. Biji tipe *dent* berbentuk besar, pipih, dan berlekuk. Di Indonesia jagung tipe ini dikenal sebagai jagung gigi kuda.
3. *Fluory maize (Zea mays* atau *amulacea* Sturt = jagung tepung) dicirikan dengan sebagian besar endosperm yang tersusun atas pati lunak.
4. *Waxy maize (Zea ceritina* Kulesh) dicirikan dengan pati yang tersusun atas amilopektin sebesar 70% dan amilosa 30%. Jagung tipe ini banyak dimanfaatkan sebagai makanan di beberapa wilayah Asia Timur dan sebagai bahan industri karena menghasilkan pati yang mirip tapioka. Di Indonesia jagung tipe ini dikenal sebagai jagung pulut. Jagung pulut memiliki gen tunggal *waxy* (wx) bersifat resesif epistasis yang terletak pada kromosom sembilan mempengaruhi

komposisi kimiawi pati, sehingga akumulasi amilosa sangat sedikit (Ferguson, 1994).

5. *Pop maize* (*Zea mays everata*) atau yang biasa disebut dengan *pop corn*. Tipe jagung ini memiliki biji berukuran kecil. Endosperm biji mengandung pati keras dengan proporsi yang lebih banyak, sedangkan pati lunak hanya sedikit dan terletak ditengah endosperm. Jika dipanaskan, uap akan masuk kedalam biji sehingga biji membesar dan pecah (*pop*).
6. *Sweet maize* (*Zea mays saccharata*) atau yang biasa disebut dengan jagung manis memiliki kandungan gula 4 – 8 kali lebih tinggi dibandingkan jagung normal pada umur 18 – 22 hari setelah penyerbukan. Sifat ini ditentukan oleh gen Sugary (SU) yang bersifat resesif, dimana gen ini menghalangi konversi gula menjadi pati.
7. *Pod maize* (*Zea tunicata* Sturt) merupakan jagung yang paling primitif. Jagung ini terbungkus oleh glume atau kelobot yang berukuran kecil. Jagung pod tidak dibudidayakan secara komersial sehingga tidak banyak dikenal. Kultivar Amerika Selatan ini dimanfaatkan oleh suku Indian dalam upacara adat karena dipercaya memiliki kekuatan magis.
8. *Quality Protein Maize* (jagung QPM) memiliki kandungan protein lisin dan triptofan yang tinggi dalam endospermnya. Jagung QPM memiliki gen *opaque-2* ( $O_2$ ) bersifat resesif yang mengendalikan produksi lisin dan triptofan.
9. *High Oil Maize* (jagung minyak tinggi) memiliki kandungan minyak lebih dari 6% sementara sebagian besar jagung hanya memiliki kandungan minyak sebesar 3,5 – 5 %. Sebagian besar minyak biji terdapat di skutelum yaitu sebesar 83 – 85 % dari total minyak dalam biji. Tipe jagung ini sangat penting dalam industri makanan seperti margarin dan minyak goreng, serta industri pakan. Tipe jagung ini memiliki tipe biji yang bermacam – macam, bisa *dent* atau *flint*.

## **2.1.4 Karakteristik Varietas Jagung (*Zea may L.*)**

### **2.1.4.1 Varietas Bluto**

Varietas Bluto merupakan salah satu varietas unggul dari pulau Madura, tepatnya kecamatan Bluto. Jagung Bluto termasuk kedalam jenis jagung mutiara. Jagung ini banyak diminati sebagai bahan pangan karena lebih tahan lama ketika disimpan. Namun, kekurangannya adalah jumlah produksinya lebih sedikit (Jawapos, 2015). Morfologi biji jagung varietas Bluto dapat dilihat pada gambar 2.6.



Gambar 2.6 Jagung Varietas Bluto (Jawapos, 2015).

### **2.1.4.2 Varietas Manding**

Jagung varietas Manding merupakan salah satu varietas unggul dari pulau Madura, tepatnya kecamatan Manding. Jagung Manding bertipe mutiara dan berwarna kuning. Jagung ini mampu bertahan terhadap penyakit bulai. Varietas Manding memiliki umur yang pendek yakni waktu berbunga 38 - 42 hari dan keluar rambut 39 - 45 hari. Varietas Manding memiliki tinggi tanaman sebesar 106,9 cm dengan batang kecil berdiameter 1,0-1,75 cm dan tahan rebah (Arifin & Fatmawati, 2011).



Gambar 2.7 Jagung Varietas Manding (Arifin *et al.*, 2010).

### 2.1.5 Manfaat Jagung

Jagung merupakan tanaman sereal penting di dunia. Di Indonesia, jagung dimanfaatkan sebagai sumber karbohidrat utama selain beras. Secara medis, jagung telah dijadikan sebagai sumber pangan fungsional dan makanan pokok bagi pasien tertentu, misalnya pasien diet. Unsur pangan fungsional pada jagung dapat dilihat pada tabel 2.1. Kandungan serat pangan yang tinggi pada jagung menjadikannya sumber karbohidrat yang penting bagi penderita diabetes melitus dan kelainan jantung. Serat termasuk zat non gizi yang efektif menjaga kolesterol dan kadar gula dalam darah agar tetap normal dengan cara meningkatkan sekresi asam empedu ke feses, sehingga terjadi peningkatan konversi kolesterol dalam darah menjadi asam empedu dalam hati. Serat pangan dapat memperlambat kecepatan pencernaan dalam usus, memberikan rasa kenyang lebih lama, dan memperlambat kemunculan glukosa darah, sehingga insulin yang dibutuhkan untuk mentransfer glukosa ke sel – sel tubuh dan diubah menjadi energi semakin sedikit (Joseph, 2002; Leveille, 1977; Wijaya, 2002).

Tabel 2.1 Unsur Pangan Fungsional pada Jagung (Wijaya, 2002)

Unsur pangan fungsional	Sumber bahan	Manfaat bagi kesehatan
Serat pangan / <i>dietary fiber</i>	Jagung	Mengantisipasi kanker, menjaga kolesterol dan gula darah, menurunkan hipertensi, mengatasi obesitas, dll.
Asam lemak esensial	Jagung	Tumbuh kembang sistem saraf termasuk otak, dll.
$\beta$ – karoten (pro vitamin A)	Jagung kuning	Antikanker, antihiperlipidemia, antithrombotik, dan antivirus
Asam amino esensial (Lisin dan Triptofan)	Jagung QPM	Membangun hubungan silang protein (kolagen, elastin) dan biosintesis karnitin prekursor serotonin / nikotinamid (vit. B), dll.
Mineral:		
Fe	Jagung merah	Pembentukan sel darah merah, dll.
Ca	Jagung	Pembentukan tulang, dll.
P	Jagung	Pemeliharaan pertumbuhan dan kesehatan tulang
Mg	Jagung	Mempertahankan denyut jantung normal dan kekuatan tulang
Vitamin:		
B / Thiamin	Jagung	Menjaga kesehatan saraf dan fungsi kognitif
B / Niacin	Jagung	Mengantisipasi penyakit pellagra
E	Kernel jagung	Antioksidan dan membantu pertumbuhan
Asam folat	Jagung	Mengantisipasi kelahiran bayi tidak normal
B 12	Jagung	Mencegah anemia

Selain sebagai bahan pangan, jagung juga dimanfaatkan sebagai bahan utama pembuatan pakan. Hal ini disebabkan jagung mengandung energi termetabolis relatif lebih tinggi dibandingkan pakan lainnya. Jagung juga mengandung asam lemak tak jenuh, terutama asam linoleat yang berguna bagi ayam

petelur untuk meningkatkan ukuran telur dan sintesis hormon reproduksi (Tangendjaja, 2002).

Jagung juga dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol karena memiliki kandungan pati yang relatif tinggi. Hal ini sesuai dengan kondisi saat ini, dimana sedang digalakkan pemanfaatan sumber energi alternatif, salah satunya adalah penggunaan bahan bakar alternatif pengganti minyak bumi yaitu bioetanol. Bioetanol lebih ramah lingkungan karena tidak memberikan tambahan netto karbondioksida pada lingkungan, karena CO<sub>2</sub> yang dihasilkan dari pembakaran etanol diserap kembali oleh tumbuhan (Suarni & Yasin, 2011). Selain biji, bagian – bagian lain tanaman jagung juga dapat dimanfaatkan. Misalnya, daun jagung dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak kambing dan sapi, batang dan tulang jagung (janggel) dapat dimanfaatkan sebagai kayu bakar dan kelobot jagung dapat digunakan sebagai pengganti kertas sigaret pada rokok serta dapat digunakan sebagai pembungkus makanan kecil seperti dodol (Mubyarto, 2002).

## **2.2 Cekaman Salinitas dan Respon Tanaman terhadap Cekaman Salinitas**

Salinitas adalah kondisi tanah yang ditandai dengan konsentrasi garam terlarut yang tinggi. Salinitas merupakan faktor pembatas utama bagi produktivitas tanaman di dunia (Karmoker *et al.*, 2008; Flower *dalam* Bakht *et al.*, 2011; Munns & Tester, 2008). Cekaman salinitas tergolong dalam cekaman abiotik yang dapat mempengaruhi pertumbuhan, fisiologi dan aktivitas biokimia tanaman seperti aktivitas fotosintesis dan kandungan klorofil (Hajer *et al.*, 2006; Saleh, 2012). Dampak yang ditimbulkan akibat adanya cekaman salinitas merupakan hasil interaksi yang kompleks antara morfologi, proses fisiologi dan biokimia termasuk perkecambahan benih, pertumbuhan tanaman, perkembangan reproduksi dan penyerapan air serta unsur hara (Akbarimoghaddam *et al.*, 2011; Singh & Chatrath, 2001; Bano & Fatima, 2009). Tingkat salinitas yang tinggi pada tanah menyebabkan terjadinya toksisitas ion, stres osmotik, kekurangan

nutrisi (N, Ca, K, P, Fe, dan Zn) dan stres oksidatif pada tanaman, dan dengan demikian membatasi penyerapan air dari tanah (Bano & Fatima, 2009).

Cekaman salinitas menyebabkan kapasitas fotosintesis menurun, hal ini karena tanaman mengalami stres osmotik dan penutupan sebagian stomata serta rusaknya klorofil pada daun (Drew *et al. dalam* Dolatabadian *et al.*, 2011; Turan *et al. dalam* Rohanipoor *et al.*, 2013). Stres osmotik disebabkan oleh kelebihan  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Cl}^-$  di lingkungan yang menurunkan potensial osmotik zat terlarut dalam tanah dan akumulasi berlebih dari sodium pada dinding sel tanaman (Munn *dalam* Bakht *et al.*, 2011; Rasool *et al.*, 2013). Stres osmotik terjadi segera setelah konsentrasi garam disekitar akar meningkat hingga mencapai ambang batas, hal ini mengakibatkan pertumbuhan tunas menurun secara signifikan, daun baru muncul lebih lambat dan perkembangan tunas lateral lebih lambat atau bahkan tidak berkembang sehingga cabang dan tunas lateral yang terbentuk hanya sedikit.

Ambang batas konsentrasi garam NaCl pada kebanyakan tanaman sekitar 40mM atau kurang untuk tanaman yang sensitif terhadap salinitas seperti padi dan jagung (Munns & Tester, 2008). Stres osmotik menyebabkan tingkat pertumbuhan menurun secara signifikan dan perubahan fenotip pada tanaman (Parida & Das *dalam* Stofberg *et al.*, 2015; Munn *dalam* Bakht *et al.*, 2011). Pada lingkungan salin, penting bagi tanaman untuk mempertahankan keseimbangan osmotik. Karena jika tekanan osmotik tidak seimbang akan berakibat pada hilangnya turgiditas, dehidrasi sel, dan akhirnya terjadi kematian sel (Ashraf, 2004).

Gejala keracunan (toksisitas) pada tanaman muncul ketika garam (seperti sodium, chlorine, dan boron) terus bertambah pada jaringan daun sehingga menyebabkan klorosis, nekrosis dan kematian pada daun tua (Parida & Das *dalam* Stofberg *et al.*, 2015). Keracunan ion hanya terjadi pada daun tua karena daun yang tua tidak lagi berkembang atau memanjang sehingga tidak dapat melarutkan garam yang terakumulasi seperti yang dilaku-



kan daun muda, akibatnya daun tua akan mati (Munns & Tester, 2008).

Pada beberapa tanaman perenial (seperti *Citrus* dan *Grapevines*),  $\text{Na}^+$  ditahan di akar dan batang dan hanya  $\text{Cl}^-$  yang diakumulasi di pucuk yang menjadi penyebab utama kerusakan pada tanaman. Sedangkan pada kebanyakan tanaman (seperti *graminaceous* termasuk jagung),  $\text{Na}^+$  merupakan penyebab utama kerusakan. Kerusakan akibat ion Na berkaitan dengan akumulasi ion Na pada jaringan daun dan menyebabkan nekrosis pada daun yang tua. Terjadinya nekrosis dimulai dari ujung dan tepi daun kemudian merambat kebagian tengah hingga pangkal daun (Munns dalam Bakht *et al.*, 2011).

Menurutnya tingkat pertumbuhan, daya saing dan hasil panen tanaman yang tercekam salinitas merupakan hasil dari pemendekan waktu hidup daun atau kematian daun akibat akumulasi ion Na (Munns dalam Bakht *et al.*, 2011; Munns & Tester, 2008). Selain itu, juga dapat disebabkan karena kurangnya suplai hasil fotosintesis (karbohidrat) dan hormon pada jaringan yang masih tumbuh karena laju kematian daun lebih cepat daripada laju pembentukan daun baru (Ashraf, 2004 ; Munns & Tester, 2008).

Toksistas ion merupakan hasil dari penggantian  $\text{K}^+$  oleh  $\text{Na}^+$  dalam reaksi biokimia. Ion Na dan Cl menginduksi perubahan konformasi dari protein. Ion K berperan sebagai kofaktor bagi beberapa enzim dan tidak dapat digantikan oleh  $\text{Na}^+$ . Konsentrasi  $\text{K}^+$  yang tinggi dibutuhkan untuk mengikat tRNA pada ribosom sehingga terjadi sintesis protein (Zhu dalam Shrivastava & Kumar, 2015).

Cekaman salinitas memicu terjadinya stres oksidatif. Pada kondisi salin, stomata cenderung menutup sehingga mengurangi ketersediaan  $\text{CO}_2$  di daun dan menghambat fiksasi karbon. Hal ini menyebabkan kloroplas melakukan eksitasi energi secara berlebihan dan pada akhirnya meningkatkan pembentukan ROS (*Reactive Oxygen Species*) (Ahmad & Sharma, 2008; Chinnusamy *et al.*, 2006).

Kekurangan nutrisi pada tanaman yang tercekam salinitas disebabkan oleh penurunan penyerapan fosfor (P) secara signifikan pada tanah salin. Hal ini karena ion fosfat mengendap bersama ion Ca (Bano & Fatima, 2009). Pengaruh salinitas terhadap perkembangan reproduksi tanaman adalah menghambat mikrosporogenesis dan pemanjangan filamen, mempercepat program kematian sel pada beberapa tipe jaringan, aborsi ovul dan penuaan pada embrio fertil (Ashraf, 2004).

Spesies tanaman memiliki mekanisme yang berbeda dalam mengatasi cekaman salinitas, seperti menutup stomata untuk membatasi transpirasi, memproduksi zat terlarut untuk menurunkan tekanan osmotik pada daun, dan mengeluarkan garam dari jaringan yang sensitif untuk mencegah kerusakan (Parida & Das *dalam* Sotfberg *et al.*, 2015). Respon ketahanan tanaman terhadap salinitas yang umum terjadi adalah overekspresi gen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport. Mekanisme  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport berfungsi untuk membuang  $\text{Na}^+$  keluar sel ataupun ke dalam vakuola, sehingga tumbuhan untuk sementara dapat terhindar dari keracunan. Proses  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport pada plasma membran dan tonoplas dari sel akar mungkin meningkat dalam kondisi salin, tetapi tidak semua spesies mempunyai mekanisme yang sama (Kreps *et al.*, 2000 ; Tester & Basic, 2005).

### **2.3 Seleksi *In vitro* dan Induksi Variasi**

Kultur *in vitro* atau yang biasa disebut kultur jaringan merupakan metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman, seperti sel, sekelompok sel, jaringan, dan organ, serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik, sehingga bagian – bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman yang lengkap (Gunawan, 1992). Teknik kultur *in vitro* memanfaatkan sifat totipotensi tumbuhan yang berarti setiap sel tumbuhan mampu menurunkan sifat dan mempunyai potensi yang sama dengan induknya untuk tumbuh dan berkembang bila ditumbuhkan pada lingkungan yang sesuai (Thorpe *dalam* Murni, 2010). Organ tanaman yang digunakan dalam kultur jaringan disebut eksplan. Bagian tanaman yang

paling baik untuk dijadikan eksplan adalah bagian tanaman yang masih muda karena selnya masih aktif membelah (Aryati *et al.*, 2005). Hal yang paling penting dalam kultur *in vitro* adalah merangsang sel atau jaringan tanaman agar menjadi meristematis kembali (Ignacimuthu, 1997).

Respon pertumbuhan secara umum dalam kultur *in vitro* meliputi diferensiasi langsung dan tidak langsung yaitu melalui pembentukan kalus. Kalus merupakan hasil antara dalam morfogenesis, meliputi organogenesis dan embriogenesis dan akhir dari proses ini adalah terbentuknya planlet (Thorpe *dalam* Murni, 2010). Kalus terbentuk dari sel yang mengalami pembelahan terus menerus dan tidak terdiferensiasi dengan baik (Walton *et al.*, 1999). Kalus terdiri dari jaringan meristematis yang berasal dari perlukaan bagian tanaman. Kalus merupakan wujud dari dediferensiasi sel. Dediferensiasi sel merupakan reversi dari sel hidup yang telah terdiferensiasi menjadi meristem kembali. Inisiasi kalus merupakan salah satu langkah penting dalam kultur *in vitro*, selanjutnya sel dipicu agar berdiferensiasi sehingga terbentuk akar dan tunas (Suryowinoto, 2000).

Media kultur yang paling umum digunakan untuk inisiasi kalus adalah media MS (*Murashige and Skoog's*) karena media ini paling cocok sebagai media dasar kultur *in vitro* untuk regenerasi tanaman dari jaringan dan kalus (Hendaryono & Wijayani, 1994; Beyl *dalam* Aryani *et al.*, 2005). Media MS dapat digunakan untuk hampir semua jenis tanaman, memiliki kandungan garam organik lebih tinggi dibandingkan media lainnya, dan senyawa nitrogen terdapat dalam bentuk  $\text{NO}_3^-$  (nitrat) dan  $\text{NH}_4^+$  (ammonium), sehingga dapat mempertahankan kondisi pH media (Hendaryono & Wijayani, 1994; Husni, 1997). Komposisi utama media MS adalah garam mineral, sumber karbon, zat pengatur tumbuh (ZPT) dan bahan pematid berupa agar (Ignacimuthu, 1997; Scragg, 1997).

Manfaat kultur *in vitro* adalah (1) mendapatkan tanaman baru dengan fisiologi dan morfologi yang sama dalam jumlah banyak dan waktu yang relatif cepat, (2) memperoleh varietas

unggul dalam waktu relatif cepat, (3) melestarikan tanamam, terutama tanaman yang terancam punah (biokonservasi plasma nutfah), (4) menghasilkan metabolit sekunder sebagai obat, dan (5) menaikkan devisa negara (Hendaryono & Wijayani, 1994). Kultur *in vitro* sering dimanfaatkan untuk perbaikan karakter tanaman seperti karakter ketahanan tanaman.

Pada kultur *in vitro* teknik yang sering digunakan untuk perbaikan karakter tanaman adalah seleksi *in vitro* dan variasi somaklonal. Menurut Predieri *dalam* Sujatmiko *et al.*, (2012), seleksi *in vitro* adalah seleksi yang dilakukan terhadap eksplan pada kultur *in vitro* menggunakan elisitor. Sedangkan menurut Purmaningsih & Mariska (2005), seleksi *in vitro* merupakan salah satu metode dari keragaman somaklonal (variasi somaklonal), namun lebih efektif dan efisien. Hal ini dikarenakan perubahan genetik yang terjadi lebih diarahkan pada sifat yang diinginkan dengan menggunakan agen seleksi pada media kultur atau dengan memberikan kondisi tertentu untuk merubah karakter somaklonal yang dibutuhkan (Karp *dalam* Lestari, 2006). Metode tersebut telah banyak dimanfaatkan untuk memperoleh varian - varian tanaman yang resisten terhadap herbisida dan cekaman lingkungan.

Keunggulan menggunakan seleksi *in vitro* yaitu tidak terlalu dipengaruhi faktor lingkungan, memungkinkan dilakukannya seleksi pada tingkat sel dengan satu faktor tunggal (Wenzel & Foroughi-Wehr *dalam* Purmaningsih & Mariska, 2005). Pada berbagai tanaman seleksi *in vitro* telah terbukti dapat menghasilkan varietas baru yang tahan dan sifat tersebut dapat diwariskan pada keturunannya. Mutasi atau perubahan karakter yang diwariskan dapat terbentuk pada fase sel bebas (kalus) pada tahap kultur *in vitro* atau pada eksplan karena adanya sel - sel bermutan pada jaringan tertentu (Mariska *et al.*, 2001)

Perbanyakan melalui kultur jaringan memungkinkan terjadinya variabilitas genetik pada planlet yang dihasilkan (Livy & Gunawan, 1988). Larkin & Scowcroft *dalam* Hutami *et al.*, (2006) menyatakan bahwa tanaman yang diperbanyak melalui

kultur *in vitro* dapat menyebabkan variasi somaklonal pada setiap planletnya. Keragaman somaklonal berasal dari keragaman genetik eksplan dan keragaman genetik yang terjadi didalam kultur *in vitro*. Keragaman genetik yang terjadi didalam kultur jaringan antara lain disebabkan oleh penggandaan jumlah kromosom (fusi endomitosis), perubahan struktur kromosom (pindah silang), perubahan gen, dan sitoplasma (Ahlowalia *dalam* Hutami *et al.*, 2006).

#### **2.4 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)**

Marka molekuler merupakan teknik yang digunakan untuk menganalisis genom. Penerapan teknologi marka molekuler utamanya untuk memonitor variasi susunan DNA di dalam spesies tanaman (Pabendon, 2004). Terdapat 3 marka yang umum digunakan yaitu marka morfologi, marka protein dan marka DNA. Marka morfologi didasarkan pada hereditas Mendel dimana karakter morfologi dijadikan sebagai indikator gen spesifik dan penanda gen dalam kromosom karena sifat yang mempengaruhi morfologi akan diturunkan. Protein dapat digunakan sebagai marka genetik karena protein merupakan produk dari ekspresi gen. Protein yang sudah populer digunakan sebagai marka genetik adalah isozym. Marka DNA adalah sebagian kecil DNA yang dapat menunjukkan polimorfisme diantara individu yang berbeda (Liu, 1998).

Salah satu marka molekuler berbasis PCR yang banyak digunakan dalam mengidentifikasi keragaman pada tingkat intraspesies maupun interspesies adalah RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) (Jena & Das, 2006). Selain RAPD, marka molekuler yang umum digunakan di Indonesia antara lain *Simple Sequence Repeat* (SSR), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Amplified Length Polymorphism* (AFLP), dan mikro satelit (Bardacki *dalam* Pharmawati, 2009; Langga *et al.*, 2012).

Teknik RAPD digunakan untuk mendeteksi polimorfisme ruas nukleotida pada DNA dengan menggunakan sebuah primer tunggal yang memiliki rangkaian nukleotida acak (William *et al.*

*dalam* Pharmawati, 2009). Primer merupakan rangkaian oligonukleotida pendek dengan panjang 10 bp yang akan berikatan dengan bagian (*site*) komplemennya (Anggereini, 2008). Keuntungan menggunakan teknik RAPD dibandingkan dengan teknik lainnya adalah RAPD bersifat lebih sederhana, mudah dilakukan, cepat memberikan hasil, menghasilkan polimorfisme pita DNA dalam jumlah banyak dan mudah memperoleh primer acak yang diperlukan untuk menganalisis genom semua jenis organisme (Bardacki *dalam* Pharmawati, 2009; Langga *et al.*, 2012). Hal ini dikarenakan teknik RAPD tidak memerlukan informasi awal mengenai urutan DNA genom organisme yang diuji dan tidak memerlukan probe DNA yang spesifik (Pharmawati, 2009). Teknik RAPD hanya memerlukan DNA yang relatif murni dan dalam jumlah yang relatif kecil dibandingkan dengan RFLP (Langga *et al.*, 2012).

Faktor yang mempengaruhi keberhasilan teknik RAPD didasarkan pada kesesuaian primer dan optimasi proses PCR. Primer yang tidak spesifik dapat menyebabkan teramplifikasinya daerah lain dalam genom yang tidak dijadikan sasaran atau sebaliknya tidak ada daerah genom yang teramplifikasi. Optimasi PCR diperlukan untuk menghasilkan karakter yang diinginkan. Optimasi menyangkut suhu denaturasi dan *annealing* DNA dalam mesin PCR (Suryanto, 2003). Faktor lain yang juga mempengaruhi keberhasilan dari teknik RAPD adalah komponen reaksi PCR meliputi, konsentrasi DNA *template*, konsentrasi DNA enzim *polymerase*, konsentrasi primer dan jumlah siklus termal (Prana & Hartati, 2003).

**“Halaman Ini Sengaja Dikosongkan”**

## **BAB III METODOLOGI**

### **3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biosains dan Teknologi Tumbuhan Biologi ITS dan Laboratorium Molekuler Rumah Sakit Khusus Infeksi UNAIR pada bulan Januari 2016 sampai dengan Juli 2016.

### **3.2 Alat dan Bahan**

#### **3.2.1 Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik, gelas arloji, gelas beker, Erlenmeyer, labu ukur, gelas ukur, botol kultur, saringan teh, pipet ukur, *bulb*, *Laminar Air Flow* (LAF), peralatan diseksi (skalpel, pinset, spatula, gunting dan jarum), *hand sprayer*, bunsen, cawan Petri, pipet volumetrik, corong, botol leher angsa, rak kultur, oven, *hot plate stirrer*, autoklaf, mortar, pestle, kompor, lemari es, mikropipet, tabung ependorf, vortex, *Refrigerated Benchtop Microsentrifuse* Kitman - 24, alat *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Rotor – Gene Q, Elektroforesis DNA Mupid – *Exu Submarine Electrophoresis System*, *UV Light Transilluminator* Biostep.

#### **3.2.2 Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah glukosa, agar, NaCl (0 ppm, 2500 ppm, 5000 ppm dan 7500 ppm), media dasar MS, aquades, aquabides steril, alkohol 96% dan 70%, NaOCl 5,25%, sabun cair, spiritus, detergen, karet tahan panas, plastik tahan panas, kertas label, tissue, plastik wrap, aluminium foil, kertas saring, kertas lakmus universal, larutan antifungal 2gr/L, 2,4 D (*dichlorophenoxy acetic acid*), bahan buffer pH: NaOH 1 N dan HCl 1 N, Biji jagung varietas Bluto dan Manding yang sudah masak fisiologis, CTAB (*cetyl trimethyl ammonium bromide*) 3%, gel agarose 2%, buffer Tris-Borat-EDTA (TBE), EtBr, CIAA (*chloroform isoamylalcohol*), etanol 70% dingin, dan etanol absolut dingin.



### **3.3 Metode yang Digunakan**

#### **3.3.1 Tahap Persiapan**

##### **3.3.1.1 Sterilisasi Ruangan**

Semua alat yang akan digunakan dimasukkan kedalam *Laminar Air Flow* (LAF). Alat disemprot terlebih dahulu dengan alkohol 70% sebelum dimasukkan. Selanjutnya dilakukan sterilisasi ruang kerja dengan menyalakan *UV lamp* pada LAF selama 2 jam. Kemudian *blower* LAF dinyalakan selama 30 – 60 menit dan meja kerja LAF disemprot dengan alkohol 70%. Setelah itu dibersihkan menggunakan *tissue* steril. Prosedur kerja secara aseptis dilakukan di dalam LAF.

##### **3.3.1.2 Sterilisasi Peralatan**

Sterilisasi peralatan yang dilakukan untuk tiap jenis peralatan dalam kultur jaringan diuraikan sebagai berikut:

#### **A. Botol Kultur**

Botol kultur terlebih dahulu dicuci bersih dan direndam menggunakan NaOCl yang dilarutkan kedalam air selama semalam ( $\pm 24$  jam). Setelah itu, dibilas dan disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Kemudian disimpan pada rak penyimpanan botol.

#### **B. Alat Gelas**

Proses sterilisasi alat-alat gelas seperti labu ukur, Erlenmeyer, gelas beker, gelas ukur, dan cawan Petri dimulai dengan mencuci alat-alat tersebut, lalu dikeringkan, ditutup menggunakan kertas. Setelah itu, dioven dengan suhu  $80^{\circ}\text{C}$  selama 2 jam. Untuk cawan Petri, di autoklaf dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

#### **C. Peralatan Lainnya**

Peralatan lain seperti peralatan diseksi (seperti skalpel, pinset, spatula, gunting, dll), *magnetic stirrer*, dan sendok dicuci dan dikeringkan. Kemudian untuk peralatan diseksi dibungkus

dengan plastik tahan panas. Semua peralatan disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

Sebelum dimasukkan kedalam LAF, semua peralatan terlebih dahulu disemprot menggunakan alkohol 70% dan pembungkus dibuka didalam LAF. Saat memulai dan dalam proses bekerja, alat diseksi yang digunakan (skalpel dan pinset) dicelupkan kedalam alkohol 96% dan dilewatkan diatas api bunsen.

### 3.3.1.3 Sterilisasi Medium

Botol kultur yang telah berisi medium dalam kondisi botol tertutup disterilisasi. Proses sterilisasi dilakukan dengan menggunakan autoklaf dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Setelah itu, medium disimpan di ruang inokulasi.

### 3.3.1.4 Sterilisasi Eksplan

Proses sterilisasi eksplan benih *Z. mays* varietas Bluto dan Manding dilakukan dengan beberapa tahapan yakni:

1. Benih dicuci di air mengalir selama 15 menit.
2. Benih direndam dalam air yang telah dicampur dengan sabun cair dan diputar menggunakan *magnetic stirrer* pada *hot plate magnetic stirrer* selama 30 menit. Setelah itu, dibilas menggunakan aquades steril selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan sterilisasi dalam LAF.
3. Benih direndam dalam larutan antifungal 2 gr/L selama 15 menit.
4. Benih direndam dalam larutan NaOCl 5, 25% selama 5 menit.
5. Tahap terakhir perendaman dilakukan dengan merendam benih dalam alkohol 70% selama 10 menit dan di rendam dalam aquades steril selama 5 menit.
6. Semua tahap sterilisasi dilakukan sebanyak 1 kali.
7. Eksplan yang telah disterilisasi diletakkan pada kertas saring steril. Kemudian dilanjutkan ke tahap inokulasi penginduksian kalus.

### **3.3.2 Tahap Penelitian**

#### **3.3.2.1 Induksi Kalus**

Pada proses induksi kalus medium yang digunakan adalah MS0 dimana dalam media tersebut ditambahkan ZPT yakni 2,4-D dengan konsentrasi 3 ppm. Langkah pertama benih yang sudah disterilkan dipotong menjadi 2 bagian endospermya lalu diinokulasikan kedalam botol kultur dengan cara diambil dengan pinset. Pinset dimasukkan ke dalam alkohol 96%, dibakar dengan api bunsen, diletakkan diatas cawan Petri steril untuk menunggu dingin (bagian ujung pinset tidak boleh terkena alas meja kerja LAF). Kemudian botol kultur diambil dan dibuka tutup plastik botol, dikeluarkan air yang ada didalam botol dengan cara membalikkan botol (mulut botol tidak boleh tersentuh meja kerja LAF). Mulut botol kultur diputar di api bunsen. Selanjutnya, endosperm jagung diambil dan diinokulasi ke dalam botol kultur yang telah berisi medium (diusahakan ujung pinset tidak menyentuh medium). Setelah itu, bagian ujung pinset dibakar dengan api bunsen dan dicelupkan ke dalam alkohol 96%. Mulut botol kultur diputar kembali pada api bunsen. Tutup plastik steril diambil dan dilewatkan diatas api bunsen (jangan sampai terbakar), lalu ditutupkan pada botol kultur yang telah berisi eksplan. Selanjutnya, diikat rapat dengan menggunakan karet. Setelah semua proses inokulasi selesai, botol kultur ditandai menggunakan kertas label yang berisi:

- a) Varietas benih jagung
- b) Tanggal inokulasi
- c) Medium yang digunakan

Setelah eksplan diinokulasi, langkah selanjutnya adalah disimpan dalam ruang kultur pada kondisi gelap. Kemudian eksplan diinkubasi selama 28 hari pada suhu  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (Balkrishna & Shankarrao, 2013), dan setiap dua minggu sekali dilakukan subkultur ke medium baru.

### 3.3.2.2 Seleksi In Vitro

Setelah kalus terbentuk, kalus disubkultur ke medium seleksi yakni MS0 + 2,4-D 3 ppm + konsentrasi NaCl (0, 2500, 5000, dan 7500 ppm) dan diinkubasi selama 28 hari dalam ruang kultur pada kondisi gelap. Kalus yang digunakan dalam tahap seleksi invitro adalah kalus dengan karakter morfologi remah (*friable*).

### 3.3.2.3 Pembuatan Gel Agarose

Gel agarose yang digunakan dalam penelitian ini ada dua macam yaitu gel agarose 0.8% dan gel agarose 2%. Gel agarose 0.8% digunakan untuk cek awal hasil ekstraksi DNA. Pembuatan agarose 0.8% dilakukan dengan mencampurkan serbuk agarose sebanyak 0,32 gram dan larutan TBE 0,5x sebanyak 40 ml didalam Erlenmeyer. Larutan dipanaskan dan dihomogenkan dengan menggunakan *hot plate magnetic stirrer* hingga bening dan mendidih. Setelah itu, suhu larutan dibiarkan turun dan ditambahkan EtBr sebanyak 5 µl. Kemudian dituang ke dalam cetakan agar. Agarose dibiarkan hingga memadat.

Gel agarose 2% digunakan untuk fraksinasi produk PCR. Pembuatan agarose 2% dilakukan dengan mencampurkan serbuk agarose sebanyak 0,8 gram dan larutan TBE 0,5x sebanyak 40 ml didalam Erlenmeyer. Larutan dipanaskan dan dihomogenkan dengan menggunakan *hot plate magnetic stirrer* hingga bening dan mendidih. Setelah itu suhu larutan dibiarkan turun dan ditambahkan EtBr sebanyak 5 µl. Kemudian dituang ke dalam cetakan agar. Agarose dibiarkan hingga memadat.

### 1.3.2.4 Ekstraksi DNA dan Analisis RAPD

Proses ekstraksi DNA dilakukan menggunakan metode CTAB (*cetyl trimethyl ammonium bromide*) 3% dengan beberapa modifikasi sesuai dengan penelitian Saputro (2012). Skema ekstraksi DNA secara detail dapat dilihat pada gambar 3.9. Hasil ekstraksi DNA di elektroforesis dengan gel agarose 0.8% untuk melakukan cek awal hasil ekstraksi DNA.


Analisis RAPD dilakukan menurut penelitian Saghai-Maroo *et al.*, dalam Balkrishna & Shankarrao (2013) yang telah dimodifikasi. Pada proses ini dicampurkan reaksi sebanyak 25  $\mu$ l (tabel 3.2). Selanjutnya semua reaksi tersebut dicampur. Setelah itu, dilakukan PCR menggunakan PCR *Rotor-Gene Q*. Reaksi PCR diprogram untuk 30 siklus seperti pada gambar 3.8. Selanjutnya produk PCR di visualisasi menggunakan *elektroforesis DNA Mupid - exu submarine electrophoresis system*. Pada teknik elektroforesis menggunakan gel agarose 2% yang ditambahkan 0,5x buffer Tris-Borat-EDTA (TBE) dan di running pada tegangan 50 volt. Fragmen DNA yang telah terseparasi di dokumentasikan dengan *UV Light Transilluminator Biostep*.

Tabel 3.1 Reagen untuk proses PCR

Komponen	Volume
KAPPA2G Fast ReadyMix (2x)	12,5 $\mu$ l
primer acak	1,5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O steril	10 $\mu$ l
DNA template	1 $\mu$ l

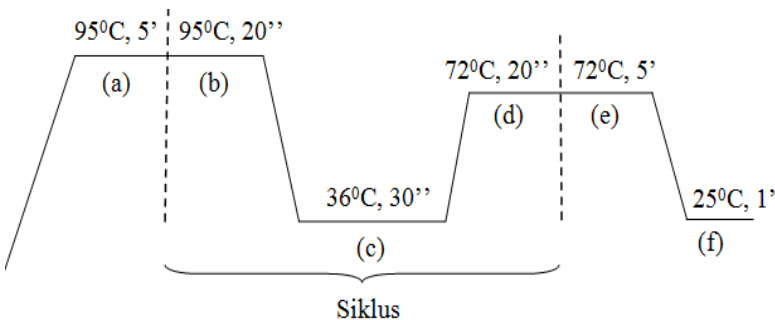
Tabel 3.2 Daftar primer dan urutan basa nitrogen yang digunakan untuk analisis RAPD

No.	Primer	Urutan Primer (5' – 3')	Jumlah Pasangan Basa
1	OPA 02	TGC CGA GCT G	10
2	OPA 10	GTG ATC GCA G	10
3	OPA 13	CAG CAC CCA C	10
4	OPB 07	GGT GAC GCA G	10
5	OPC 02	GTG AGG CGT C	10



Kalus toleran ditimbang dengan berat 55-80 mg
Dimasukkan kalus kedalam <i>microtube</i> 1,5 ml
Ditambahkan CTAB 3% (100 $\mu$ l)
Diinkubasi di <i>Dry Block Heating Thermostat</i> 15 menit pada suhu 60 <sup>0</sup> C
Digerus sampai halus
Ditambahkan CTAB 3% (100 $\mu$ l) dan divorteks sebentar
Diinkubasi di <i>Dry Block Heating Thermostat</i> 20 menit pada suhu 60 <sup>0</sup> C dan sesekali divorteks
Ditambahkan 500 $\mu$ l CIAA ( <i>chloroform isoamylalcohol</i> ) dan diinversi (dibolak – balik) pelan - pelan
Dilakukan sentrifugasi menggunakan <i>Refrigerated Benchtop Mikrosentrifuge Kitman-24</i> (10 menit, 5000 rpm, suhu 4 <sup>0</sup> C)
Diambil supernatan, dan dipindahkan ke <i>microtube</i> baru
Ditambahkan ethanol absolut dingin (1:1) lalu disimpan di suhu -20 <sup>0</sup> C selama 1 jam
Dilakukan sentrifugasi selama 10 menit, 12000 rpm
Supernatan dibuang
Ditambahkan ethanol 70 % dingin sebanyak 400 - 500 $\mu$ l
Dilakukan sentrifugasi (1 menit, 12000 rpm, suhu 4 <sup>0</sup> C)
Dibuang supernatan pada masing-masing sampel. Pelet yang terbentuk dikeringanginkan
Ditambahkan TBE buffer pH 8 (50 $\mu$ l) dan disimpan pada suhu - 20 <sup>0</sup> C

Gambar 3.1 Tahap Proses Ekstraksi DNA.



Gambar 3.2 Tahap Proses PCR: (a) Denaturasi awal (b) Denaturasi (c) Annealing/Penempelan (d) Elongasi/Ekstensi (e) Elongasi Akhir (f) finishing.

### 3.3.3 Tahap Pengamatan Parameter

#### 3.3.3.1 Persentase Kalus Hidup

Pengamatan pada persentase kalus hidup, dengan rumus (Htwe *et al.*, 2011) :

$$\text{Persentase Kalus Hidup (\%)} = \frac{\text{Jumlah Kalus yang Toleran}}{\text{Jumlah Kalus yang Diinokulasi}} \times 100\%$$

#### 3.3.3.2 Morfologi Kalus

Parameter yang diamati dalam morfologi kalus terdiri dari warna dan tekstur kalus. Warna kalus pada umumnya adalah warna putih, kuning, ungu, hijau, hingga coklat kehitaman (Santoso & Nursandi, 2003). Sedangkan untuk tekstur kalus dapat dibedakan atas kalus yang bertekstur kompak (*non friable*), remah (*friable*), dan kalus intermediet (perpaduan kalus kompak dan kalus remah) (Sugiyarto & Paramita, 2014). Kalus kompak mempunyai tekstur yang padat dan keras, yang tersusun dari sel – sel kecil yang sangat rapat, sedangkan kalus remah mempunyai tekstur lunak dan tersusun dari sel dengan ruang antar sel yang banyak (Wardani, 2004). Kalus yang baik merupakan kalus yang memiliki struktur remah (*friable*) karena mudah untuk dipisahkan menjadi sel – sel tunggal dan dapat meningkatkan aerasi oksigen antar selnya (Lizawati, 2012).

### 3.3.3.3 Pertumbuhan Kalus

Pertumbuhan kalus diukur dengan cara menimbang berat segar kalus sebelum seleksi (*Initial growth*) dan sesudah seleksi kalus (*Final growth*). Selanjutnya, dilakukan perhitungan dengan rumus:

$$\text{Pertumbuhan Kalus} = \text{Final growth} - \text{Initial growth}$$

### 3.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan dilakukan pengulangan 3 kali, sehingga total unit percobaan sebanyak 24 (24 botol kultur). Pengamatan dilakukan selama 28 hari untuk induksi kalus dan 28 hari untuk seleksi *in vitro*. Tabel rancangan penelitian dapat dilihat dibawah ini:

Tabel 3.3 Pengamatan Persentase Kalus Hidup pada Seleksi *In Vitro*

Konsentrasi Varietas	Konsentrasi NaCl											
	A			B			C			D		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Bluto	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
	a,1	a,2	a,3	b,1	b,2	b,3	c,1	c,2	c,3	d,1	d,2	d,3
Manding	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
	a,1	a,2	a,3	b,1	b,2	b,3	c,1	c,2	c,3	d,1	d,2	d,3

Keterangan :  
 A = konsentrasi 0 ppm  
 B = konsentrasi 2500 ppm  
 C = konsentrasi 5000 ppm  
 D = konsentrasi 7500 ppm



Tabel 3.4 Pengamatan Pertambahan Berat Kalus pada Seleksi *In Vitro*

<div>Konsen- trasi</div> <div>Varietas</div>	Konsentrasi NaCl											
	A			B			C			D		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Bluto	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
	a,1	a,2	a,3	b,1	b,2	b,3	c,1	c,2	c,3	d,1	d,2	d,3
Manding	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
	a,1	a,2	a,3	b,1	b,2	b,3	c,1	c,2	c,3	d,1	d,2	d,3

Keterangan :    A = konsentrasi 0 ppm  
                      B = konsentrasi 2500 ppm  
                      C = konsentrasi 5000 ppm  
                      D = konsentrasi 7500 ppm

Tabel 3.5 Pengamatan Hasil Analisis RAPD

No.	Primer	Urutan Basa (5' – 3')	Bluto	Manding
1	OPA 02	TGC CGA GCT G	Polimorfisme/ monomorfisme	Polimorfisme/ monomorfisme
2	OPA 10	GTG ATC GCA G	Polimorfisme/ monomorfisme	Polimorfisme/ monomorfisme
3	OPA 13	CAG CAC CCA C	Polimorfisme/ monomorfisme	Polimorfisme/ monomorfisme
4	OPB 07	GGT GAC GCA G	Polimorfisme/ monomorfisme	Polimorfisme/ monomorfisme
5	OPC 02	GTG AGG CGT C	Polimorfisme/ monomorfisme	Polimorfisme/ monomorfisme

### 3.5 Analisis Data

Data hasil pengamatan parameter (persentase kalus hidup dan pertambahan berat kalus) dianalisis dengan analisis statistik yaitu uji Anova (*Analysis of Variance*) satu faktor pada taraf kepercayaan 95%. Hipotesis yang digunakan adalah sebagai berikut:

$H_0$ : variasi konsentrasi NaCl tidak berpengaruh terhadap persentase kalus hidup dan pertumbuhan relatif kalus.

$H_1$ : variasi konsentrasi NaCl berpengaruh terhadap persentase kalus hidup dan pertumbuhan relatif kalus.

Jika terdapat satu perlakuan atau lebih yang memberikan hasil berbeda nyata dengan kontrol maka  $H_0$  ditolak atau konsentrasi NaCl yang berbeda memberi pengaruh terhadap persentase kalus hidup dan pertumbuhan relatif kalus. Jika  $H_0$  maka dilakukan uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) pada taraf 5%, dengan menggunakan program SPSS *Statistical Software*. Data hasil pengamatan morfologi kalus dan analisis RAPD akan di analisis secara deskriptif.

**“Halaman Ini Sengaja Dikosongkan”**

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **4.1 Pengaruh Cekaman Salinitas (NaCl) terhadap Morfologi Kalus**

Pada penelitian ini, induksi kalus dari biji jagung varietas Bluto dan Manding menghasilkan kalus yang berwarna putih, putih kekuningan dan putih kehijauan dengan sebagian besar teksturnya remah, seperti yang tampak pada tabel 4.7 dan 4.8. Kalus yang terbentuk sebagian besar berwarna putih dan putih kekuningan. Pada induksi kalus digunakan zat pengatur tumbuh auksin (2,4 D) 3 ppm dan kondisi lingkungan yang gelap. Auksin dikenal sebagai hormon yang menginduksi pembentukan kalus, menghambat kerja sitokinin membentuk klorofil pada kalus dan juga mempengaruhi kestabilan genetik sel tanaman (Santoso & Nursandi, 2004). Selain itu, auksin dapat meningkatkan permeabilitas sel terhadap air dan melunaknya dinding sel yang diikuti dengan menurunnya tekanan dinding sel, sehingga air dapat masuk kedalam sel dan volume sel meningkat (Sriyani & Wijayani *dalam* Trimulyono *et al.*, 2004).

Warna terang atau putih menunjukkan bahwa kalus masih cukup baik. Kalus yang berwarna putih merupakan jaringan embrionik yang belum mengandung kloroplas, tetapi memiliki kandungan butir pati yang tinggi. Kalus dapat berubah menjadi hijau jika ditambahkan zat pengatur tumbuh sitokinin dan stimulus cahaya, sehingga proplastid yang terdapat dalam jaringan parenkim berdiferensiasi menjadi plastid yang mengandung klorofil (Tsuro, 1998).

Sel yang ditumbuhkan melalui kultur jaringan memiliki siklus sel yang lebih panjang yaitu pada fase S dimana DNA disintesis dan direplikasi. Replikasi DNA secara terus menerus menyebabkan terjadinya rearsenemen kromosom. Ketidakstabilan genetik inilah yang menyebabkan terjadinya keragaman genetik pada kultur jaringan (Lee & Philips *dalam* George *et al.*, 2008). Griffiths *et al.* *dalam* Harahap (2015) menjelaskan bahwa

keragaman genetik pada kultur jaringan disebabkan oleh penggandaan jumlah kromosom (fusi, endomitosis), perubahan struktur kromosom, perubahan gen dan perubahan sitoplasma. Keragaman genetik dapat dicapai dengan cara memperpanjang fase dimana sel belum berdiferensiasi (fase pengkalusan).

Selanjutnya, kalus disubkultur selama 28 hari atau selama 4 minggu pada medium seleksi yang mengandung NaCl dengan konsentrasi 0 ppm, 2500 ppm, 5000 ppm dan 7500 ppm. Setiap 7 hari dilakukan pengamatan terhadap perubahan morfologi kalus. Perubahan morfologi kalus sebelum dan sesudah perlakuan cekaman salinitas dapat dilihat pada tabel 4.7 dan 4.8, serta perubahan warna pada kalus dapat dilihat pada gambar 4.10 dan 4.11.

Ukuran kalus berbeda – beda pada tiap perlakuan, seperti yang terlihat pada gambar 4.10 dan 4.11. Bahkan, kalus hasil induksi kalus pun memiliki ukuran yang berbeda – beda. Hal ini karena masing – masing kalus memiliki kepekaan dan daya serap yang berbeda terhadap media. Selain itu, struktur kalus yang merupakan kumpulan dari banyak sel menyebabkan sel – sel yang berada dilapisan dalam tidak dapat melakukan kontak dengan media pertumbuhan (Trimulyono *et al.*, 2004).

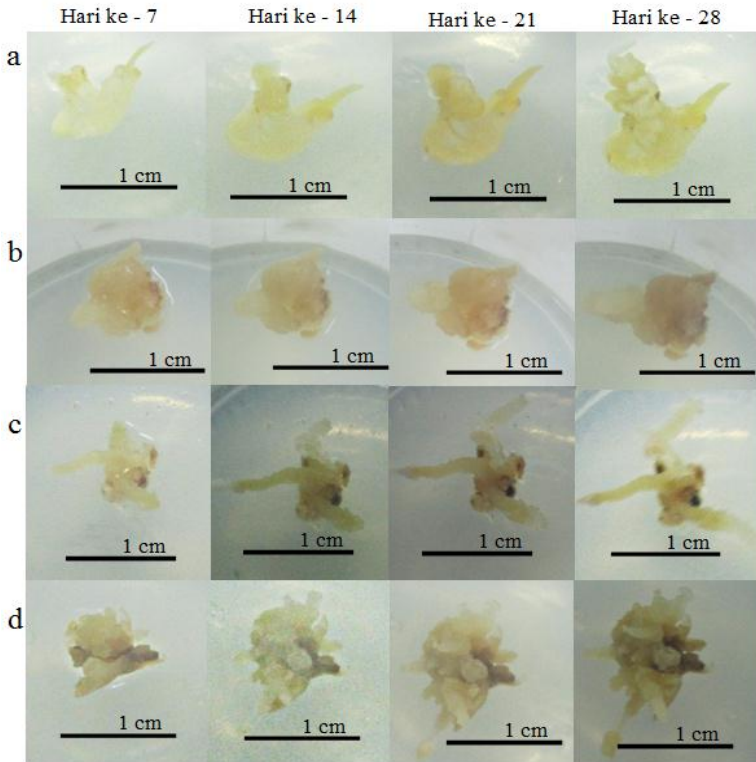
Tipe kalus juga berpengaruh terhadap ukuran kalus. Pada penelitian ini seberapa besar kalus yang terbentuk memiliki tipe remah namun, beberapa diantaranya memiliki tipe kompak dan intermediet (kompak dan remah). Kalus remah tersusun atas sel – sel yang panjang dan longgar karena banyak memiliki ruang antar sel. Sedangkan, kalus kompak tersusun atas sel – sel yang kecil dan rapat (Strosse *et al.*, dalam Dwimahyani, 2007; Lizawati, 2012; Trimulyono *et al.*, 2004). Oleh karena itu, kalus remah memiliki ukuran yang lebih besar dibandingkan dengan kalus kompak meskipun jika ditimbang kedua kalus memiliki berat yang sama. Seperti yang terjadi pada kalus varietas Bluto yang dicekam NaCl 7500 ppm (gambar 4.10d) dan kalus varietas Manding yang dicekam NaCl 7500 ppm (gambar 4.11d).

Tabel 4.1 Morfologi Kalus Bluto Sebelum dan Sesudah di Cekam NaCl

konsentrasi NaCl (ppm)	Ulangan ke -	Warna Kalus		Tekstur Kalus	
		Awal	Akhir	Awal	Awal
0 ppm	1	Putih	Hijau	remah	remah
	2	Putih	Kuning	kompak	remah
	3	Putih	Kuning	remah	remah
2500 ppm	1	Putih	Putih	intermediet	remah
	2	Putih	Putih	intermediet	remah
	3	Putih	coklat kehitaman	intermediet	remah
5000 ppm	1	putih kekuningan	coklat kehitaman	remah	intermediet
	2	Kuning	putih kekuningan	remah	remah
	3	Kuning	coklat	intermediet	intermediet
7500 ppm	1	kuning kehijauan	putih kekuningan	remah	remah
	2	Kuning	putih kecoklatan	remah	kompak
	3	putih kehijauan	putih kekuningan	remah	remah

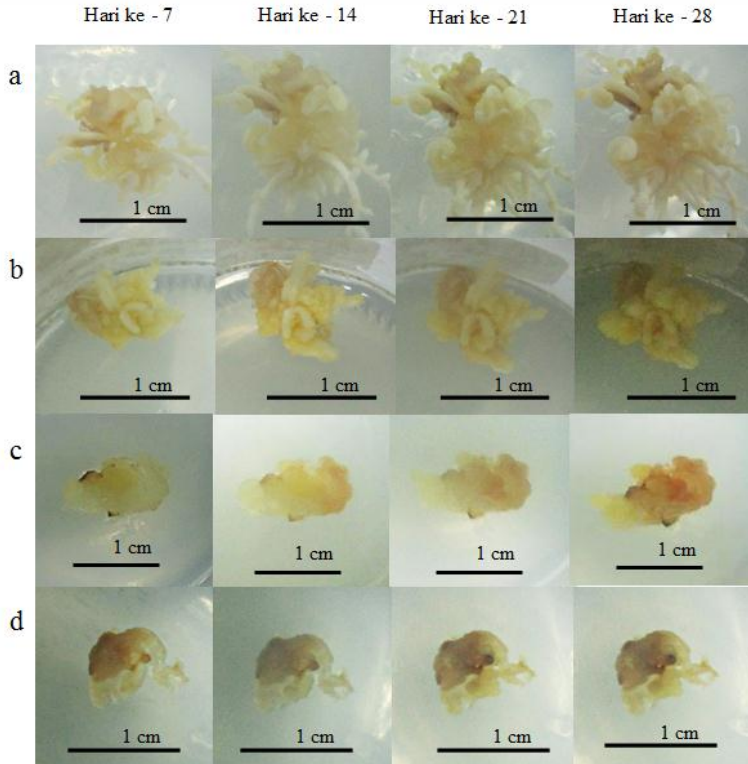
Tabel 4.2 Morfologi Kalus Manding Sebelum dan Sesudah di Cekam NaCl

konsentrasi NaCl (ppm)	Ulangan ke -	Warna Kalus		Tekstur Kalus	
		Awal	Akhir	Awal	Awal
0 ppm	1	Putih	putih	remah	remah
	2	Putih	putih kekuningan	remah	remah
	3	putih kekuningan	putih kekuningan	intermediet	kompak
2500 ppm	1	Kuning	kuning	kompak	kompak
	2	putih kekuningan	kuning kecoklatan	remah	remah
	3	Kuning	kuning tua	remah	remah
5000 ppm	1	Putih	kuning	remah	remah
	2	putih kekuningan	kuning kecoklatan	intermediet	remah
	3	putih kekuningan	cokelat muda	remah	remah
7500 ppm	1	Putih	cokelat muda	remah	intermediet
	2	putih kekuningan	kuning kecoklatan	remah	intermediet
	3	Kuning	kuning kecoklatan	remah	remah



Gambar 4.1 Morfologi kalus Bluto pada konsentrasi salinitas yang berbeda, a) 0 ppm, b) 2500 ppm, c) 5000 ppm, d) 7500 ppm.





Gambar 4.2 Morfologi Manding pada konsentrasi salinitas yang berbeda, a) 0 ppm, b) 2500 ppm, c) 5000 ppm, d) 7500 ppm.

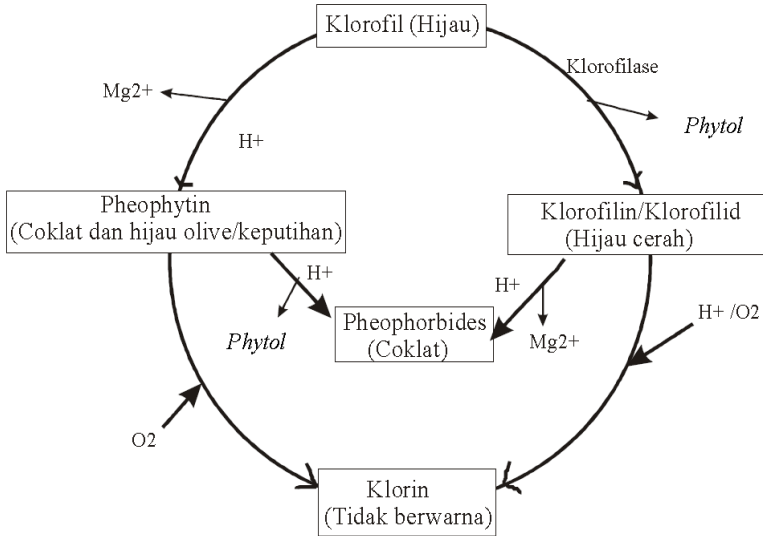
Berdasarkan pengamatan tampak bahwa terjadi perubahan warna kalus yang disubkultur pada medium dengan NaCl, yaitu dari putih menjadi coklat hingga kehitaman. Berbeda dengan kalus yang disubkultur pada medium tanpa NaCl, dimana kalus masih berwarna hijau atau kekuningan hingga akhir masa subkultur. Hal serupa terjadi pada penelitian Rattana & Bunnag (2015), dimana kalus padi mengalami pencoklatan (*browning*) dan nekrosis setelah disubkultur kedalam medium dengan NaCl. Pencoklatan (*browning*) dan nekrosis semakin tinggi seiring dengan meningkatnya konsentrasi NaCl pada medium. Beberapa

penelitian lain juga mengungkapkan bahwa penambahan NaCl dapat meningkatkan konsentrasi  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Cl}^-$  dalam sitoplasma. Hal ini menyebabkan terjadinya toksisitas sehingga pertumbuhan kalus terganggu. Penambahan NaCl kedalam medium kultur jaringan juga menyebabkan terjadinya nekrosis dan menurunnya tingkat pertumbuhan (Khorami & Safarnejad, 2011; Badawy *et al.*, 2008; Htwe *et al.*, 2011).

Pencoklatan (*browning*) pada kalus dapat dijadikan sebagai indikator terjadinya nekrosis atau kerusakan jaringan atau produksi senyawa fenol sebagai respon terhadap cekaman (Wu, *et al.*, 2005). Pencoklatan disebabkan karena oksidasi senyawa fenol oleh polifenoloksidase peroksidase atau karena terpapar udara (Laine & David dalam Rattana & Bunnag, 2015; Santoso & Nursandi, 2004). Koc *et al.*, (2009) menjelaskan bahwa ada banyak faktor abiotik dan biotik yang dapat menginduksi sintesis atau akumulasi senyawa fenol pada tanaman. Naz *et al.*, (2008) mengungkapkan bahwa tingginya kandungan fenol umumnya berasosiasi dengan tingginya enzim yang meregulasi sintesis senyawa fenol sedangkan intensitas pencoklatan berhubungan dengan hiperaktivitas dari enzim oksidatif.

Pencoklatan pada kalus juga dapat disebabkan karena terjadinya degradasi klorofil sebagai akibat dari hilangnya rantai *phytol* oleh enzim klorofilase, sehingga terbentuk klorofilin atau klorofilid yang menghasilkan warna hijau cerah. Klorofilid didegradasi lebih lanjut menjadi *pheophorbides* (berwarna coklat) dan klorin (tidak berwarna). Kondisi salin yang tinggi dapat meningkatkan aktivitas enzim pendegradasi klorofil yaitu klorofilase (Noreen & Ashraf *et al.*, dalam Sevengor *et al.*, 2011). Degradasi klorofil juga dapat disebabkan oleh proses fotooksidasi, karena pada proses tersebut  $\text{Mg}^{2+}$  hilang dan membentuk *pheophytin* yang berwarna coklat dan hijau olive (keputihan) (Santoso & Nursandi, 2004). Proses degradasi klorofil dapat diamati pada gambar 4.12. Banyaknya subkultur yang dilakukan juga dapat menyebabkan terjadinya pencoklatan pada kalus. Seperti penelitian yang dilakukan Rattana & Bunnag

(2015), dimana kalus padi yang disubkultur sebanyak tiga kali pada medium yang mengandung NaCl 175 mM atau konsentrasi yang lebih tinggi berubah warna menjadi coklat dan perlahan mati.



Gambar 4.3 Proses Degradasi Klorofil (Santoso & Nursandi, 2004).

#### 4.2 Pengaruh Cekaman Salinitas (NaCl) terhadap Persentase Kalus Hidup

Seluruh kalus yang digunakan dalam penelitian ini dapat hidup hingga akhir masa cekaman. Data lengkap ketahanan kalus pada cekaman salinitas dapat dilihat pada tabel 4.9.

Tabel 4.3 Persentase Kalus Hidup pada Seleksi *In Vitro* selama 28 hari

Varietas	Konsentrasi NaCl			
	A	B	C	D
Bluto	100%	100%	100%	100%
Manding	100%	100%	100%	100%

Keterangan: A = konsentrasi 0 ppm  
 B = konsentrasi 2500 ppm  
 C = konsentrasi 5000 ppm  
 D = konsentrasi 7500 ppm

Berdasarkan tabel 4.9 tampak bahwa kalus jagung varietas Bluto dan Manding memiliki presentase kalus hidup 100% pada setiap perlakuan. Hal ini sesuai dengan tabel 4.7 dan 4.8, dimana pada akhir masa subkultur kalus masih memiliki struktur remah (*friable*) yang menandakan kalus masih bertahan hidup hingga akhir masa subkultur. Kalus yang baik memiliki tekstur remah (*friable*) sehingga mudah dilakukan pemisahan menjadi sel – sel tunggal untuk kultur suspensi. Kalus remah memiliki susunan sel yang longgar sehingga mudah dipisah – pisahkan dan dapat meningkatkan aerasi antar sel serta sel – selnya bersifat meristematik (Strosse *et al.*, dalam Dwimahyani, 2007; Lizawati, 2012).

Tanaman melakukan dua macam respon pada kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan yaitu, respon toleran (aktif) dan respon *avoidance* (pasif). Namun, pada umumnya tanaman menggunakan kombinasi dari dua respon tersebut untuk bertahan terhadap lingkungan yang tidak menguntungkan (Mandre dalam Ibrahim, 2013). Respon aktif biasanya dilakukan

dengan mengakumulasi osmolit seperti asam amino (prolin) dan metabolit sekunder (fenol). Sedangkan respon pasif, pada cekaman kekeringan meliputi, peningkatan alokasi biomasa menuju akar, pengguguran daun dan menurunnya konduktivitas stomata. Respon pasif terhadap cekaman salinitas meliputi mekanisme eksklusi, sekresi, pengguguran daun, dan penyimpanan air oleh tanaman sukulen (Ibrahim, 2013).

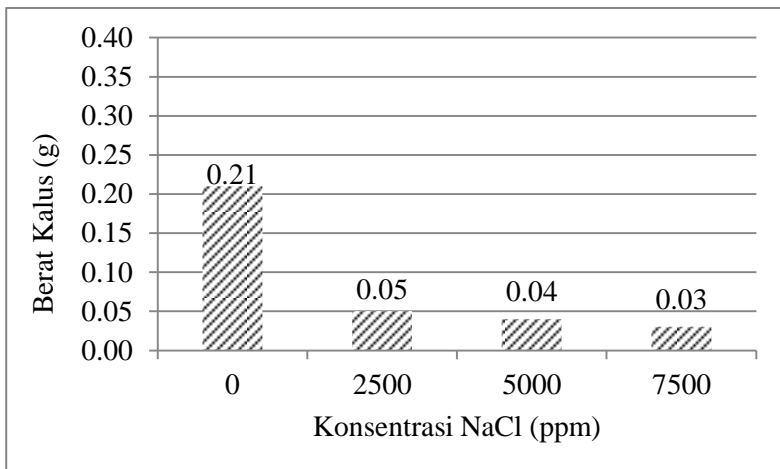
Penelitian ini menunjukkan bahwa kalus dari kedua varietas jagung yang digunakan mampu melakukan mekanisme toleran terhadap cekaman salinitas. Tanaman jagung melakukan berbagai adaptasi pada tingkat subseluler, seluler dan organ agar dapat bertahan dalam cekaman salinitas, seperti perubahan osmotik, regulasi stomata, merubah keseimbangan hormonal dan mengaktifkan sistem pertahanan antioksidan. Perubahan osmotik merupakan kunci adaptasi tanaman pada tingkat seluler, dimana sel akan mensintesis senyawa terlarut organik (osmolit) untuk menurunkan potensial air tanpa mengurangi kandungan air dalam sel (Serraj & Sinclair, 2002). Osmolit yang banyak disintesis pada kondisi cekaman salinitas adalah sukrosa, prolin, glisin betain, asam organik dan trehalosa. Pada tanaman jagung, kandungan prolin dan glisin betain pada jaringan akan meningkat pada kondisi cekaman salinitas (Kaya *et al.*, 2010; Mansour, *et al.*, 2005).

Ketika tanaman dipapar cekaman salinitas, maka tanaman akan mengakumulasi metabolit sekunder dan asam amino. Prolin merupakan asam amino yang umum diakumulasi oleh tanaman pada kondisi cekaman salinitas dan kekeringan. Konsentrasi prolin akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi NaCl. Prolin diakumulasi didalam sitoplasma untuk bertahan terhadap konsentrasi garam tinggi. Prolin memberikan perlindungan osmotik pada sel (Bartels & Sunkar *dalam* Kaviani, 2008; Haghighi *et al.*, 2012; Misra *et al.*, *dalam* Al Hattab *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, *dalam* Al Hattab *et al.*, 2015).

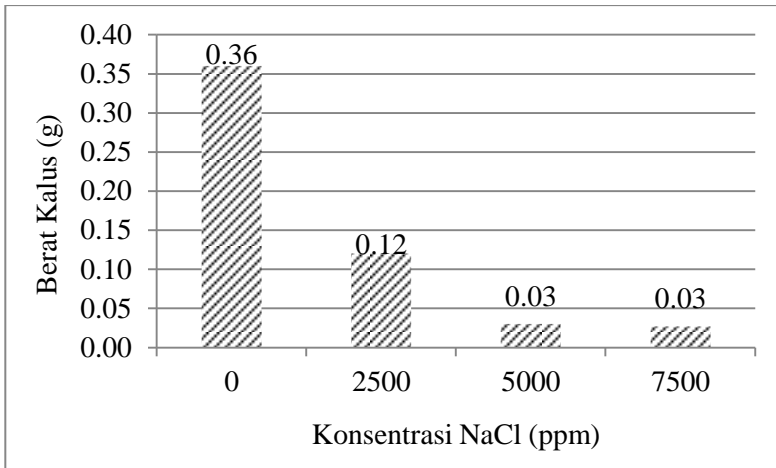
#### 4.3 Pengaruh Cekaman Salinitas (NaCl) terhadap Pertambahan Kalus

Data pertambahan kalus didapatkan dari perhitungan selisih berat basah kalus setelah dicekam NaCl selama 28 hari (*final growth*) dan berat basah kalus sebelum dicekam NaCl (*initial growth*). Data berat basah kalus pada kedua varietas dapat dilihat pada lampiran 1 dan 2.

Biomassa yang dihasilkan dari kultur jaringan sangat tergantung pada kecepatan sel – sel tersebut membelah diri dan memperbanyak diri yang dilanjutkan dengan pembesaran sel. Siklus sel berpengaruh terhadap proses pembelahan sel dan sintesis protein, hal ini juga mempengaruhi laju pertambahan kalus. Menurut Lakitan *dalam* Trimulyono *et al.* (2004), setiap sel dapat memiliki siklus sel yang berbeda tidak hanya antar spesies tetapi juga antar individu dari spesies yang sama, hal tersebut dipengaruhi oleh lingkungan atau perlakuan saat perkembangan pada pohonnya. Pertambahan kalus dapat dilihat pada grafik 4.1 dan 4.2.



Grafik 4.1 Grafik Pertambahan Berat Kalus Varietas Bluto.



Grafik 4.2 Grafik Pertambahan Berat Kalus Varietas Manding

Berdasarkan grafik diatas, tampak bahwa pertambahan kalus jagung varietas Bluto dan Manding semakin menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi NaCl pada medium. Pertambahan kalus terendah terjadi pada konsentrasi NaCl 7500 ppm, yaitu sebesar 0.03 g baik pada kalus varietas Bluto maupun varietas Manding. Hal ini menunjukkan kedua varietas jagung mampu bertahan pada konsentrasi tertinggi cekaman salinitas. Berdasarkan hal tersebut, dapat dikatakan bahwa konsentrasi tertinggi dari cekaman salinitas yang digunakan dalam penelitian ini belum menjadi konsentrasi *lethal* dari kedua varietas.

Berdasarkan hasil uji ANOVA *One Way* (lampiran 3) , perlakuan cekaman NaCl pada kalus jagung varietas Bluto berpengaruh terhadap berat kalus. Hal ini ditunjukkan dengan nilai  $p < 0.05$  ( $p = 0.001$ ). Selanjutnya, uji dilanjutkan dengan metode *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) 5% untuk membandingkan perlakuan cekaman yang paling efektif diantara semua perlakuan. Hasil uji DMRT menunjukkan bahwa pertambahan kalus pada perlakuan 0 ppm (kontrol) lebih tinggi dibandingkan dengan kalus yang diberi perlakuan NaCl (2500

ppm, 5000 ppm, 7500 ppm). Pertambahan kalus tertinggi terjadi pada perlakuan 0 ppm (kontrol) sedangkan pertambahan kalus terendah terjadi pada perlakuan 7500 ppm (cekaman tertinggi). Perlakuan 0 ppm berbeda nyata dengan perlakuan 2500 ppm, 5000 ppm, dan 7500 ppm. Sedangkan perlakuan 2500 ppm, 5000 ppm, dan 7500 ppm tidak berbeda nyata. Data pertambahan kalus dapat dilihat pada tabel 4.10.

Tabel 4.4 Pertambahan Kalus Jagung Varietas Bluto pada Kontrol dan Perlakuan NaCl (2500, 5000, 7500)

Perlakuan (ppm)	Pertambahan Kalus (g)
<b>0</b>	0.21 <sup>b</sup>
<b>2500</b>	0.05 <sup>a</sup>
<b>5000</b>	0.04 <sup>a</sup>
<b>7500</b>	0.03 <sup>a</sup>

Keterangan: Angka yang ditandai huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata dengan uji DMRT pada taraf 5%.

Berdasarkan hasil uji ANOVA *One Way* (lampiran 4) , perlakuan cekaman NaCl pada kalus jagung varietas Manding tidak berpengaruh terhadap pertambahan kalus. Hal ini ditunjukkan dengan nilai  $p > 0.05$  ( $p = 0.053$ ). Oleh karena itu, uji tidak dapat dilanjutkan dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT). Hal ini menunjukkan bahwa kalus varietas Manding lebih tahan terhadap cekamn salinitas dibandingkan dengan varietas Bluto.

Penurunan terhadap pertambahan kalus merupakan fenomena yang umum terjadi dalam kultur jaringan dengan cekaman salinitas. Sel yang tercekam salinitas menghabiskan lebih banyak energi untuk metabolismenya dibandingkan dengan sel yang tidak tercekam salinitas. Akan tetapi, sebagian besar energi yang dihasilkan digunakan untuk melakukan perubahan



osmotik, akibatnya terjadi penurunan pada masa sel (Babu *et al.*, dalam Yunita *et al.*, 2014; Patil & Rao, 2012).

Pada umumnya, kondisi salinitas tinggi dapat menurunkan penyerapan ion N, Ca, K, P, Fe, dan Zn (Karimi *et al.*, 2005; Turan *et al.*, 2010). Pada tanaman jagung, ion  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Cl}^-$  merupakan ion yang sangat toksik. Tingginya konsentrasi  $\text{Na}^+$  mengganggu penyerapan ion  $\text{K}^+$  yang merupakan unsur penting dan diperlukan dalam jumlah yang cukup besar. Ion  $\text{K}^+$  berfungsi untuk mempertahankan keseimbangan osmotik serta berperan dalam pembukaan dan penutupan stomata (Tuteja & Mahajan, 2005; James *et al.*, 2011). Selain itu, Marschner (2005), menyatakan bahwa tingginya konsentrasi NaCl mampu menyebabkan penurunan permeabilitas sel terhadap air dan mengakibatkan menurunnya laju masuknya air ke dalam sel.

Blokhina dalam Al – Hussaini (2005) menyatakan bahwa konsentrasi NaCl dalam medium kultur jaringan mempengaruhi konsentrasi  $\text{Na}^+$  pada kalus. Pada konsentrasi yang tinggi, ion toksik tersebut menyebabkan membran tidak stabil dengan cara menggantikan ion  $\text{K}^+$  dan  $\text{Ca}^{2+}$  serta menyebabkan sel kehilangan banyak air. Konsentrasi NaCl yang tinggi menyebabkan ion  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Cl}^-$  dalam sitoplasma meningkat. Akibatnya, sintesis zat pengatur pertumbuhan terhambat dan terjadi keracunan sel (Khorami & Safarnejad, 2011)

#### 4.4 Analisis RAPD

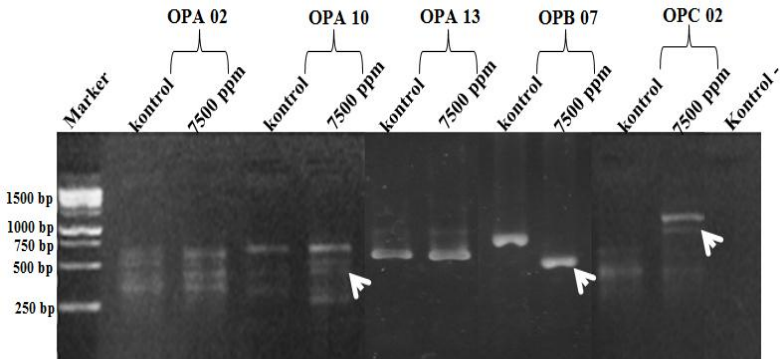
Variasi genetik kalus Bluto dan Manding perlakuan 0 ppm dan 7500 ppm NaCl dianalisis menggunakan teknik penanda molekuler RAPD. Marker yang digunakan dalam proses elektroforesis produk PCR – RAPD dalam penelitian ini adalah Geneaid 1 kb. Pada penelitian ini tidak dilakukan pengukuran konsentrasi DNA sehingga DNA template yang digunakan tidak seragam. Hal ini karena, pada penelitian ini hanya melihat ada atau tidaknya polimorfisme. Hasil analisis RAPD dapat dilihat pada tabel 4.11 dan 4.12. Sedangkan, visualisasi pita DNA yang teramplifikasi pada kedua varietas dapat dilihat pada gambar 4.13 dan 4.14.

Hasil analisis RAPD menunjukkan bahwa dari lima primer acak yang digunakan hanya tiga yang menunjukkan polimorfisme pada kedua varietas yaitu OPA 10, OPB 07, dan OPC 02. Sedangkan primer OPA 02 dan OPA 13 hanya menunjukkan polimorfisme pada kalus varietas Manding. Jumlah pita DNA yang dihasilkan bervariasi (0 – 5) dan berukuran  $\pm 250 - 1500$  bp.

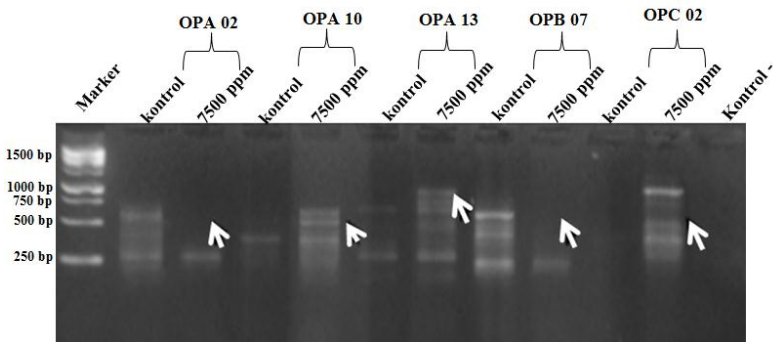
Pada varietas Bluto, primer OPA 02 dan OPA 13 menghasilkan pita DNA sebanyak 4 dan 1 dengan panjang  $\pm 250 - 750$  bp. Kedua primer tersebut tidak menunjukkan polimorfisme karena pada kalus perlakuan juga muncul pita DNA dengan jumlah dan ukuran yang sama dengan kalus kontrol. Primer OPA 10 menghasilkan 1 pita DNA dengan panjang  $\pm 500 - 750$  bp pada kontrol dan menunjukkan polimorfisme karena muncul 4 pita DNA baru berukuran  $\pm 250 - 750$  bp pada perlakuan. Primer OPB 07 menghasilkan 1 pita DNA berukuran  $\pm 500 - 750$  bp dan menunjukkan polimorfisme karena pada perlakuan tidak muncul pita DNA dengan ukuran yang sama, namun muncul pita DNA baru berukuran  $\pm 500$ . Primer OPC 02 menghasilkan 2 pita DNA berukuran  $\pm 500 - 750$  bp dan menunjukkan polimorfisme karena pada perlakuan pita DNA berukuran  $\pm 500 - 750$  bp tidak muncul namun, terbentuk 2 pita DNA baru berukuran  $\pm 750 - 1000$  bp.

Pada varietas Manding kelima primer menunjukkan polimorfisme. Primer OPA 02 menghasilkan 2 pita DNA berukuran  $\pm 250 - 750$  bp pada kontrol. Primer ini menunjukkan polimorfisme karena hanya muncul 1 pita DNA pada ukuran yang sama. Primer OPA 10 menunjukkan polimorfisme yaitu pada kontrol terbentuk 1 pita DNA berukuran  $\pm 250 - 500$  bp sedangkan, pada perlakuan menghasilkan 3 pita DNA berukuran  $\pm 250 - 750$  bp. Primer OPA 13 menghasilkan 2 pita DNA berukuran  $\pm 250 - 750$  bp pada kontrol sedangkan, pada perlakuan menghasilkan 5 pita DNA berukuran  $\pm 250 - 1000$  bp. Primer OPB 07 membentuk 3 pita DNA berukuran  $\pm 250 - 750$  bp pada kontrol sedangkan, pada perlakuan hanya terbentuk 1 pita DNA berukuran  $\pm 250 - 500$  bp. Primer OPC 02 tidak membentuk pita

DNA pada kontrol sedangkan, pada perlakuan membentuk 4 pita DNA  $\pm 250 - 1000$  bp.



Gambar 4.4 Visualisasi pita DNA yang teramplifikasi pada varietas Bluto (tanda panah menunjukkan polimorfisme pita DNA).



Gambar 4.5 Visualisasi pita DNA yang teramplifikasi pada varietas Manding (tanda panah menunjukkan polimorfisme pita DNA).

Tabel 4. 5 Hasil Analisis RAPD Kalus Jagung Varietas Bluto

Primer	Urutan Basa	Munceck Bluto			
		Kontrol	Perlakuan	Status	Keterangan
OPA 02	TGC CGA GCT G	4	4	Monomorfisme	Tidak menunjukkan perbedaan pada jumlah dan ukuran pita DNA
OPA 10	GTG ATC GCA G	1	5	Polimorfisme	Menunjukkan perbedaan jumlah dan ukuran pita DNA. Pada panjang $\pm 250 - 750$ bp pita DNA perlakuan terlihat
OPA 13	CAG CAC CCA C	1	1	Monomorfisme	Tidak menunjukkan perbedaan pada jumlah dan ukuran pita DNA
OPB 07	GGT GAC GCA G	1	1	Polimorfisme	Menunjukkan perbedaan ukuran pita DNA. Pada panjang $\pm 500$ muncul pita DNA baru dan pada 750 bp pita DNA perlakuan tidak terlihat
OPC 02	GTG AGG CGT C	2	3	Polimorfisme	Menunjukkan perbedaan jumlah dan ukuran pita DNA. Pada panjang $\pm 750$ pita DNA pada perlakuan tidak terlihat dan pada 750 - 1000 bp muncul pita DNA baru

Tabel 4.6 Hasil Analisis RAPD Kalus Jagung Varietas Manding

Primer	Urutan Basa	Manding			
		Kontrol	Perlakuan	Status	Keterangan
OPA 02	TGC CGA GCT G	2	1	Polimorfisme	Menunjukkan perbedaan jumlah dan ukuran pita DNA. Pada panjang $\pm$ 250 - 750 bp pita DNA perlakuan tidak terlihat
OPA 10	GTG ATC GCA G	1	3	Polimorfisme	Menunjukkan perbedaan jumlah dan ukuran pita DNA. Pada panjang $\pm$ 250 - 750 bp muncul pita DNA baru
OPA 13	CAG CAC CCA C	3	5	Polimorfisme	Menunjukkan perbedaan jumlah dan ukuran pita DNA. Pada panjang $\pm$ 250 - 1000 bp muncul pita DNA baru
OPB 07	GGT GAC GCA G	3	1	Polimorfisme	Menunjukkan perbedaan jumlah dan ukuran pita DNA. Pada panjang $\pm$ 250 - 750 bp pita DNA perlakuan tidak terlihat
OPC 02	GTG AGG CGT C	-	4	Polimorfisme	Menunjukkan perbedaan jumlah dan ukuran pita DNA. Pada panjang $\pm$ 250 - 1000 bp pita DNA perlakuan terlihat

Amplifikasi merupakan hasil berpasangannya nukleotida primer dengan nukleotida penyusun DNA cetakan (Hartati, 2006). Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat primer yang tidak dapat menghasilkan pita DNA atau tidak terjadi amplifikasi. Hal ini kemungkinan disebabkan tidak ada sekuen komplementer pada DNA genom atau hanya ada satu untai DNA yang mengandung sekuen komplementer dengan primer tersebut. William *et al.* dalam Randriani (2012) menjelaskan bahwa salah satu syarat utama terjadinya amplifikasi DNA dengan satu primer acak adalah jika primer tersebut mempunyai urutan basa nukleotida yang komplementer dengan kedua untai DNA genom pada posisi yang berlawanan. Amplifikasi DNA tidak terjadi apabila komplemen urutan basa nukleotida DNA cetakan terdapat pada jarak yang jauh. Amplifikasi DNA dengan PCR akan terjadi apabila komplemen basa primer dengan urutan basa DNA cetakan jaraknya tidak melebihi 5000 bp (Nurhaimi & Darussmin dalam Randriani, 2012).

Selain ditentukan oleh situs penempelan DNA, keberhasilan PCR – RAPD ditentukan pula oleh kemurnian dan keutuhan DNA template. Kualitas dan kuantitas DNA dapat dilihat dari kemurnian dan ukuran genom DNA. Kemurnian yang rendah, misalnya karena adanya metabolit sekunder (fenol) akan menghambat penempelan primer pada susunan basa DNA template (Padmalatha & Prasad, 2006). Ukuran DNA template yang kecil dapat mengurangi peluang penempelan primer pada DNA template. Demikian pula, jumlah DNA dalam komponen reaksi PCR perlu dioptimalkan untuk mendapatkan hasil amplifikasi yang konsisten. Jumlah DNA template yang terlalu banyak dan sedikit akan berpengaruh terhadap hasil amplifikasi (Sunandar & Imron, 2010).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pita DNA dapat teramplifikasi, namun memiliki kualitas yang berbeda – beda (gambar 4.13 dan 4.14). Kualitas hasil amplifikasi dapat dilihat dari jumlah jumlah pita DNA yang dapat diidentifikasi dan tingkat resolusi fragmen pita DNA yang diamplifikasi. Pada

penelitian ini, terdapat pita DNA yang memiliki resolusi rendah. Contohnya, pita DNA yang diamplifikasi primer OPA 02 (gambar 4.13) dan pita DNA yang diamplifikasi primer OPA 10 (gambar 4.14). Kedua primer tersebut menghasilkan pita DNA yang samar karena jumlah DNA template yang tidak mencukupi selama siklus PCR. Hal ini sesuai dengan pernyataan Weeden *et al. dalam* Sunandar & Imron (2010), bahwa konsentrasi DNA yang terlalu kecil sering menghasilkan pita DNA amplifikasi yang redup atau tidak jelas. Bahkan, konsentrasi DNA template yang terlalu kecil dapat menyebabkan pita DNA tidak teramplifikasi (Sunandar & Imron 2010), seperti yang terjadi pada kontrol varietas Manding yang diamplifikasi oleh primer OPC 02. Konsentrasi DNA template sangat berkaitan dengan konsentrasi primer sehingga perlu dicari optimalisasi antara konsentrasi DNA template dengan primer. Rasio yang rendah antara DNA template dan primer dapat menyebabkan produk RAPD yang dihasilkan tidak konsisten (Ali *et al.*, 2006).

*Screening* atau optimasi PCR merupakan langkah penting dalam mendapatkan pola pita yang dapat menjelaskan polimorfisme. Optimasi PCR berkaitan dengan suhu denaturasi dan *annealing* DNA dalam mesin PCR. Suhu denaturasi yang rendah dapat menyebabkan belum terbukanya untai ganda DNA sehingga tidak mungkin terjadi polimerasi DNA baru. proses penempelan primer pada untai DNA yang sudah terbuka memerlukan suhu optimum, sebab suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan amplifikasi tidak terjadi atau suhu yang terlalu rendah menyebabkan primer menempel pada sisi lain genom yang bukan sisi homolognya. Suhu *annealing* (penempelan) ditentukan berdasarkan primer yang digunakan dan dipengaruhi oleh panjang dan komposisi primer (Suryanto *dalam* Sembiring *et al.*, 2015). Pada penelitian ini, suhu *annealing* yang digunakan yaitu 36°C. Hal ini bertujuan agar primer lebih mudah menempel pada situs DNA template.

Hasil visualisasi pita DNA yang teramplifikasi (gambar 4.13 dan 4.14) menunjukkan perbedaan jumlah dan posisi pita DNA

antara kalus pada perlakuan kontrol dan perlakuan cekaman. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi polimorfisme pada kalus yang diberi perlakuan cekaman. Polimorfisme menunjukkan adanya variasi karakter genotip kalus hasil seleksi *in vitro*. Polimorfisme merupakan gambaran amplifikasi yang diperoleh dari perbedaan fragmen DNA yang diamati dan diskor sebagai ada atau tidaknya perbedaan sekuen, sehingga menunjukkan adanya variasi genetik pada rantai DNA (Ruwaida, 2009; McGregor *et al.*, 2000; Hartati, 2007).

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa perlakuan NaCl memberikan efek negatif pada morfologi kalus kemungkinan, terjadi perbedaan genetik pada kalus. Hal ini sesuai dengan Suryanto (2003) bahwa variasi genetik dapat terjadi karena adanya perubahan nukleotida penyusun DNA. Perubahan ini mungkin dapat mempengaruhi fenotip suatu organisme yang dapat dilihat secara langsung atau mempengaruhi reaksi individu terhadap lingkungan tertentu. Secara umum variasi genetik dapat terjadi karena adanya mutasi, rekombinasi, atau migrasi gen dari satu tempat ke tempat lain. Variasi genetik pada tanaman memiliki arti penting untuk pengembangan sumber genetik yang diperlukan dalam pemuliaan tanaman. Semakin tinggi variasi genetik, semakin tinggi pula peluang hidup tanaman karena mempunyai kemampuan yang lebih baik untuk beradaptasi dengan lingkungannya (Karsinah, 2002; Crowder, 2002).



**“Halaman Ini Sengaja Dikosongkan”**

## LAMPIRAN

### Lampiran 1 Pertambahan Berat Kalus Bluto

Konsentrasi NaCl	Ulangan ke -	<i>Initial Growth</i> (gr)	<i>Final Growth</i> (gr)	<i>Callus Growth</i> (gr)	Rata - rata (gr)
0 ppm	1	0.10	0.25	0.15	0.21
	2	0.18	0.45	0.27	
	3	0.08	0.28	0.20	
2500 ppm	1	0.17	0.22	0.05	0.05
	2	0.16	0.24	0.08	
	3	0.14	0.17	0.03	
5000 ppm	1	0.11	0.16	0.05	0.04
	2	0.11	0.15	0.04	
	3	0.10	0.14	0.04	
7500 ppm	1	0.16	0.18	0.02	0.03
	2	0.12	0.17	0.05	
	3	0.15	0.16	0.01	

## Lampiran 2 Pertambahan Berat Kalus Manding

Konsentrasi NaCl	Ulangan ke -	<i>Initial Growth</i> (gr)	<i>Final Growth</i> (gr)	<i>Callus Growth</i> (gr)	Rata - rata (gr)
0 ppm	1	0.16	0.32	0.16	0.36
	2	0.12	0.77	0.65	
	3	0.24	0.51	0.27	
2500 ppm	1	0.13	0.32	0.19	0.12
	2	0.13	0.16	0.03	
	3	0.10	0.24	0.14	
5000 ppm	1	0.18	0.23	0.05	0.03
	2	0.17	0.22	0.05	
	3	0.11	0.10	-0.01	
7500 ppm	1	0.16	0.21	0.05	0.03
	2	0.13	0.14	0.01	
	3	0.09	0.11	0.02	

Lampiran 3 Hasil uji ANOVA kalus jagung varietas Bluto

ANOVA					
berat_kalus					
	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.063	3	.021	17.678	.001
Within Groups	.009	8	.001		
Total	.072	11			

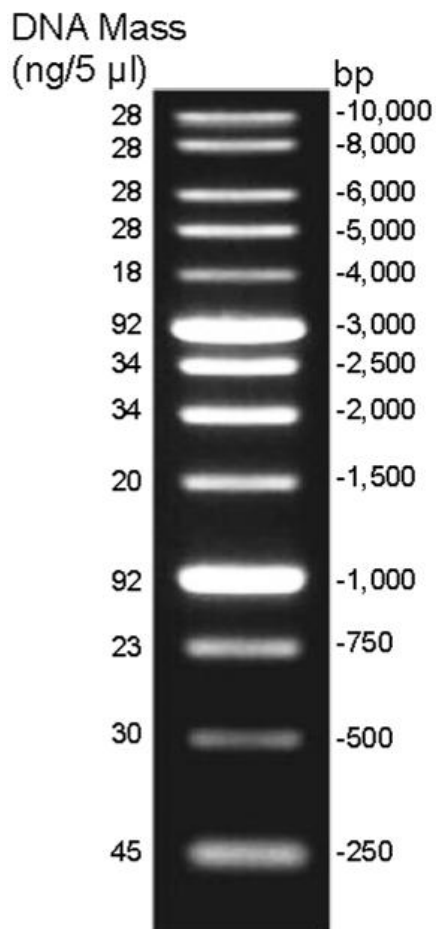
Lampiran 4 Hasil uji ANOVA kalus jagung varietas Manding

ANOVA					
Berat_Kalus					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.221	3	.074	3.956	.053
Within Groups	.149	8	.019		
Total	.370	11			

## Lampiran 5 Alur penelitian



## Lampiran 6 DNA Ladder, Geneaid 1 kb



**“Halaman Ini Sengaja Dikosongkan”**

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa tingkat ketahanan *Zea mays* varietas Manding lebih tinggi dibandingkan dengan varietas Bluto. Semakin tinggi salinitas maka akan berpengaruh terhadap perubahan morfologi warna kalus, persentase kalus hidup, dan penambahan kalus yang semakin kecil. Polimorfisme yang diperoleh melalui analisi RAPD menunjukkan adanya keragaman genetik pada kedua varietas dengan primer OPA 10, OPB 07 dan OPC 02. Sedangkan primer OPA 02 dan OPA 13 hanya menunjukkan polimorfisme pada kalus jagung varietas Manding.

#### **5.2 Saran**

Seleksi *in vitro* *Z. mays* dalam penelitian ini perlu dilakukan peningkatan konsentrasi NaCl untuk mengetahui tingkat ketahanan kalus *Z. mays* sampai tingkat lethal dimana kalus sudah tidak mampu bertahan, tahap seleksi lebih lanjut seperti tahap regenerasi kalus sampai dengan planlet yang diaklimatisasi untuk mendapatkan varietas *Z. mays* yang toleran, serta dilakukan analisis kandungan prolin, dan metabolit sekunder lainnya.



**“Halaman Ini Sengaja Dikosongkan”**

## DAFTAR PUSTAKA

Ahmad P., and Sharma S. 2008. "Salt Stress and Phyto - Biochemical Responses of Plants". **Plant Soil Environ** **54**: 89 – 99.

Akbarimoghaddam, H., Galavi, M., Ghanbari, A., and Panjehkeh, N., 2011. "Salinity Effects on Seed Germination and Seedling Growth of Bread Wheat Cultivars". **Trakia J. Sci.** **9** (1), 43–50.

Al – Hussaini, Z. A., Yousif, S. H. and Al – Ajeely, S. A. 2015. "Screening Four Potato Cultivars for Salt Tolerance". **I.J.A.B.R.**, vol 5 (2) : 181 – 186.

Al Hattab, Zahra N., Saadon A. Al-Ajeel and Ekhlas A. El Kaaby. 2015. "Effect of Salinity Stress on *Capsicum annuum* Callus Growth, Regeneration and Callus Content of Capsaicin, Phenylalanine, Proline and Ascorbic Acid". **Journal of Life Sciences** **9** (2015) 304-310.

Ali, B. A., Huang, T. H., Salem, H. H. and Xie, Q. D. 2006. "Influence of Thermal Cyder Day to Day Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprint". **Biotechnology**, **5**: 324 – 329.

Amanah, Siti., Endang L. Hastuti., Edi Basuno. 2008. "Aspek Sosial Budaya dalam Penyelenggaraan Penyuluhan: Kasus Petani Lahan Marjinal". **Jurnal Transdisiplin Sosiologi, Komunikasi, dan Ekologi Manusia**, vol. 02, No. 03

Ariani, Mewa dan Pasandaran, E. 2002. "**Pola Konsumsi dan Permintaan Jagung untuk Pangan, Ekonomi Jagung Indonesia**". Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian; Departemen Pertanian.

Arifin, Z. dan Fatmawati. 2011. "Pemurnian dan Pengembangan Jagung Varietas Manding, Talango dan Guluk-Guluk Di

Kabupaten Sumenep”. **Seminar Nasional Serealia**. Jawa Timur: Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Jawa Timur.

Aryati, H. *et al.* 2005. “Pengaruh penambahan DL- Triptofan terhadap Pertumbuhan Kalus dan Produksi Alkaloid Reserpin Pule Pandak (*Rauvolfia serpentine* L. Bentham ex Kurz.) secara *In Vitro*”. **Biofarmasi** **3** (2): 52-56.

Ashraf, M., 2004. “Some Important Physiological Selection Criteria for Salt Tolerance in Plants”. **Flora** **199**, 361–376.

Badawy, O. M., M.I. Nasr and R. A. Alhendawi., 2008. “Response of Sugarcane (*Saccharum* species hybrid) Genotypes to Embrionic Callus Induction and In Vitro Salt Stress”. **Sugar Tech.** **10**: 243 – 247.

Bakht, J. , M. Shafi, Y. Jamal and H. Sher. 2011. “Response of Maize (*Zea mays* L.) to Seed Priming with NaCl and Salinity Stress”. **Spanish Journal of Agricultural Research** **9** (1), 252-261.

Balkrishna, R. A. dan Shankarrao, S.S. 2013. “*In Vitro* Screening and Molecular Genetic Markers Associated with Salt Tolerance In Maize”. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 12(27), pp. 4251-4255.

Balkrishna, R. A. dan Shankarrao, S.S. 2013. *In Vitro* Screening and Molecular Genetic Markers Associated with Salt Tolerance In Maize. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 12(27), pp. 4251-4255.

Bano, A., Fatima, M., 2009. “Salt Tolerance in *Zea mays* (L.) Following Inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*”. **Biol. Fertility Soils** **45**, 405–413.

Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhu, Jian - Kang, 2006. "Gene Regulation During Cold Acclimation in Plants". **Physiol. Plant.** **126 (1), 52–61.**

Darrah, L. L., McCullen, M. D., Zuber, M. S., 2003. "**Breeding, Genetic, and Seed Corn Production. Chapter 2. In: PJ. White, LA Johnson, eds. *Corn: Chemistry and Technology*, Edition 2<sup>nd</sup>**". American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul Minesota, USA. pp 35 – 68.

Dolatabadian, Aria, Seyed Ali Mohammad Modarres Sanavy1, Faezeh Ghanati. 2011. "Effect of Salinity on Growth, Xylem Structure and Anatomical Characteristics of Soybean". **Not Sci Biol (Notulae Scientia Biologicae), 3 (1) : 41 – 45.**

Dwimahyani, I. 2007. "Metode Suspensi Sel Untuk Membentuk Spot Hijau Pada Kultur *In Vitro* Galur Mutan Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L)". **A Scientific Journal for The Applications of Isotopes and Radiation Vol. 3 No. 2.**

Farnham, D. E., Benson, G. O., Pearce, R. B. 2003. "**Corn Perspective and Culture. Chapter 1. In: Pj White, LA Johnson, eds. *Corn: chemistry and technology*, Edition 2<sup>nd</sup>**". American Association of Cerial Chemical, Inc. St. Paul Minesota, USA. Pp 1 – 33

Ferguson, V. 1994. "**High amylose and waxy corn. In: A. R. Halleuer (Ed.) *Specialty Corns***". USA: CRC Press Inc.

George E. F., Michael A. Hall, and Geert-Jan De Klerk. 2008. **Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition**, 205–226. Springer: Netherlands

Gunadi, Sunarto. 2002. "Teknologi Pemanfaatan Lahan Marginal Kawasan Pesisir". **Jurnal Teknologi Lingkungan, Vol. 3, No. 3: 232-236**

Gunawan, Livy Winata. 1992. "Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan". IPB.

Haghighi, Z., Karimi, N., Modarresi, M., and Mollayi, S. 2012. "Enhancement of Compatible Solute and Secondary Metabolites Production in *Plantago Ovata* Forsk. by Salinity Stress." **J. Med. Plants Res.** **6 (18): 3495-500.**

Hajer, A. S., Malibari A. A., Al - Zahrani H. S., and Almaghrabi O. A. 2006. "Responses of Three Tomato Cultivars to Sea Water Salinity 1. Effect of Salinity on The Seedling Growth". **African Journal of Biotechnology** **5: 855-861.**

Harahap , R. A. 2015. "Variasi Somaklonal Sebagai Salah Satu Sumber Keragaman Genetik Untuk Perbaikan Sifat Tanaman". **Opini Grahatani Vol. 01(3):66-75.**

Hardman and Gunsolus. 1998. "**Corn growth and Development. Extension Service**". University of Minesota. p.5.

Hartati D. 2006. "**Keragaman genetik sengon (*Albazia falcataria* L. Fosberg) melalui DNA marker**". Pusat Penelitian dan Pengembangan Hutan Tanaman (P3HT). Yogyakarta.

Hartati D. 2007. "Pendugaan keragaman genetik dalam dan antar provenan pulai (*Alastonia scholaris* (L.) R. Br.) menggunakan penanda RAPD. Tesis S1". Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.

Hendaryono, D. P. S. dan Wijayanti, A. 1994. "**Teknik Kultur Jaringan Pengenalan dan Petunjuk Perbanyakan Tanaman secara Vegetatif – Modern**". Yogyakarta: Penerbit Kanisius.

Htwe, Nwe N., Maziah Mahmood, Ho Chal Ling, Faridah Qamarus Z., Abdullah M Z. 2011. "Responses of some Selected Malaysian Rice Genotypes to Callus Induction under

In Vitro Salt Stress”. **African Journal of Biotechnology. Vol. 10 (3), pp. 350-362.**

Husni, A. 1997. “Perbanyakan dan Penyimpanan Tanaman Inggu melalui Kultur Jaringan”. **Plasma Nutfah II (1): 9 -13.**

Hutami S., Mariska, I. & Supriati, Y. 2006. “Peningkatan keragaman genetik tanaman melalui keragaman somaklonal”. **Jurnal AgroBiogen 2 (2):81-88.**

Ibrahim, Ali Hassan. 2013. “Tolerance and Avoidance Responses to Salinity and Water Stresses in *Calotropis procera* and *Suaeda aegyptiaca*. **Turk J Agric. 37: 352-360.**

Ignacimuthu, S. 1997. “**Plant Biotechnology**”. New Hampshire: Science Publisher.

James, R. A., Blake, C. S., Munns, R. 2011. “Major Genes for  $\text{Na}^+$  Exclusion, Nax1 and Nax2 (wheatHKT1;4 and HKT1;5), Decrease  $\text{Na}^+$  Accumulation In Bread Wheat Leaves Under Saline and Waterlogged Condition”. **Journal of Experimental Botany. Vol. 62, no. 8, pp. 2939-2947.**

Jawapos, Radar Madura. 2015. Petani Masih Gunakan Bibit Jagung Lokal. <<http://radarmadura.co.id>>

Jena, S.N., and A.B. Das. 2006. “Inter - population Variation of Chromosome and RAPD Markers of *Suaeda nudiflora* (Willd.) Moq. a Mangrove Species in India. **African J. Agric. Res. 1: 137-142.**

Joseph G. 2002. “**Manfaat serat makanan bagi kesehatan kita**”. Makalah Falsafah Sains. Bogor:Pascasarjana IPB.

Karimi G., Ghorbanli M., Heidari H., Khavarinejad R. A., Assareh M. H. 2005. “The Effects of NaCl on Growth, Water

Relations, Osmolytes and Ion Content in *Kochia Prostrate*". **Biol Plant** **49:301–304**.

Karmoker, J.L., S. Farhana and P. Rashid, 2008. "Effects of salinity on ion accumulation in maize (*Zea mays* L. cv. bari- 7)". **Bangl. J. Bot.**, **37(2): 203-205**.

Karsinah., Sudarsono., Setyobudi, L. dan Aswidinnoor, H. 2002. Keragaman genetik plasma nuftah jeruk berdasarkan analisis penanda RAPD. **Jurnal Bioteknologi Pertanian**, Vol. 7, No. 1, pp. 8-16. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Katriani, M. 2013. **"Proposal Disertasi: Analisis Morfofisiologi dan Hasil Jagung yang Diaplikasikan *Trichoderma* Spp dan NPK pada Lahan Kering"**. Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin Makassar.

Kaviani, B., 2008. "Proline Accumulation and Growth of Soybean Callus Under Salt and Water Stress". **Int. J. Agri. Biol.**, **10: 221–3**.

Kaya C., Tuna A. L., Okant A. M. 2010. "Effect of Foliar Applied Kinetin and Indole Acetic Acid on Maize Plants Grown Under Saline Conditions". **Turk J Agric For** **34:529–538**.

Khorami, A. and A. Safarnejad. 2011. "*In Vitro* Selection of *Foeneculum vulgare* fir Salt Tolerance". **Not. Sci. Bio.** **3: 90 – 97**.

Koc, N. K., B. Bas, M. Koc and M. Kusek. 2009. "Investigations of Invitro Selection for Salt Tolerant Lines in Sour Orange (*Citrus aurantium* L.)". **Biotechnology.** **8: 155 -159**.

Kreps, J. A. *et al.* 2002. "Transcriptome Changes for Arabidopsis in Response to Salt, Osmotic, and Cold Stress". **Plant Physiology.** **Vol. 130: 2129-2141**.

Langga, I. F., Muh. Restu dan Tutik Kuswinanti. 2012. "Optimalisasi Suhu dan Lama Inkubasi Dalam Ekstraksi DNA Tanaman Bitti (*Vitex cofassus Reinw*) Serta Analisis Keragaman Genetik dengan Teknik RAPD-PCR". **J. Sains & Teknologi**, **Vol.12 No.3 : 265 – 276**.

Latief, W. dan Amien, S. 2014. "Studi Awal Pemanfaatan Marka Molekuler RAPD untuk Penentuan Kebenaran Tiga Kultivar Nilam". **Bionatura - Jurnal Ilmu-ilmu Hayati dan Fisik Vol. 16, No. 2, hal: 109 – 113. ISSN 1411 – 0903**.

Lestari, E.G. 2006. "Review: *In Vitro* Selection and Somaclonal Variation for Biotic and Abiotic Stress Tolerance". **Biodiversitas. Vol. 7, No. 3, pp. 297-301**.

Leveille, G.A. 1977. "The role of dietary fiber in nutrition and health", *In* L.F. Hood, E.K. Wardrip and G.N. Bollenback (Eds.). Carbohydrates and Health. The AVI Publ. Co., Inc., Westport, Connecticut.

Livy, W. & Gunawan. 1988. "Teknik Kultur Jaringan Tanaman. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman", Pusat Antar Universitas. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Lizawati. 2012. Proliferasi Kalus dan Embriogenesis Somatik Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.). **Vol 1 No.4**,

MacGregor TG. 2000. "Genetic linkage mapping of the Avr1a avirulence gene in the soybean pathogen *Phytophthora sojae*. Dissertation". University of Western Ontario. Ontario, Canada.

Mansour M. M. F., Salam K.H. A., Ali F. Z. M., Abou Hadid A. F. 2005. "Cell and Plant Responses to NaCl in *Zea mays* Cultivars Differing in Salt Tolerance". **Gen Appl Plant Physiol 31:29–41**.



Mariska, I. dan Purnamaningsih, R. 2001. “Perbanyak Vegetatif Tanaman Tahunan Melalui Kultur *In Vitro*”. **Jurnal Litbang Pertanian**. No 21 (1).

Mhike, H. 2004. Improve Your Maize Harvests: “**Grow Certified Seed of Open-Pollinated Varieties**”. Didownload dari CIMMYT Institutional Multimedia Publications Repository <Http://Repository.Cimmyt.Org> [6 Januari 2016].

Munns, R., and Tester, M., 2008. “Mechanisms of Salinity Tolerance”. **Annu. Rev. Plant Biol.** **59**, 651–681.

Murni, A. Makka dan Ratna Wylis A. 2008. “**Teknologi Budidaya Jagung**”. Bogor : Balai Besar Pengkajian dan Pengembangan Teknologi Pertanian.

Murni, Pinta. 2010. “Embriogenesis somatik pada kultur *in vitro* daun kopi robusta (*coffea canephora* var. Robusta chev.)”. **Biospecies, Volume 2 No. 2**, hlm 22 – 26.

Naz, S., A. Ali and J. Iqbal .2008. “Phenolic Content In Vitro Cultures of Chick Pea (*Cicer arietinum* L.) During Callogenesis and Organogenesis”. **Pak. J. Bot.** **40:2525 – 2539**.

Ouda, S. A. E., Mohamed S. G., and Khalil F. A. 2008. “Modeling The Effect of Different Stress Conditions on Maize Productivity Using Yield-Stress Model”. **Int. J. Natural Eng. Sci.** **2 (1): 57-62**.

Pabendon, B.M. 2004. “**Pemanfaatan Marka Molekuler untuk Identifikasi Varietas Tanaman dalam Bidang Pemuliaan Tanaman**”. Makalah pribadi Sekolah Pasca Sarjana S3 Institut Pertanian Bogor.

Padmalatha, k. & Prasad, M.N.V. 2006. “Optimizaton of DNA Isolation and PCR protocol for RAPD Analysis of Selected

Medicinal and Aromatic Plants of Conservation Concern from Peninsular India”. **African J. Biotech.**, **5**: 230 – 234.

Paliwal, R.L. 2000. **“Origin, Evolution and Spread of Maize. In: RL Paliwal, G Granados, HR Latifitte, AD Vlolle. Eds. *Tropical Maize: Improvement and Production*”**. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome pp 5 -11

Pharmawati, M. 2009. “Optimalisasi Ekstraksi DNA dan PCR - RAPD pada *Grevillea* spp. (Proteaceae)”. **Jurnal Biologi XIII (1): 12-16.**

Prana, T.K., & Hartati, N.S.. 2003. “Identifikasi sidik jari DNA talas (*Colocasia esculenta* L. Schott) Indonesia dengan teknik RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*):skrining primer dan optimalisasi kondisi PCR”. Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. Cibinong. **Jurnal Natur Indonesia 5 (2): 107-112.**

Purmaningsih, R. dan Mariska, I. 2005. “Seleksi *In Vitro* Tanaman Padi Untuk Sifat Ketahanan Terhadap Aluminium”. **Jurnal Bioteknologi Pertanian. Vol. 10, No. 2, pp. 61-69.**

Purwono. dan Hartono, R. 2008. **“Bertanam Jagung Unggul”**. Jakarta: Penebar Swadaya.

Randriani, E. Cici Tresniawati dan Syafaruddin. 2012. “Pemanfaatan Teknik Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Untuk Pengelompokan secara Genetik Plasma Nutfah Jambu Mete (*Anacardium Occidentale* L.)”. **Buletin RISTRI Vol 3 (1).**

Rao S. and P. Patil, 2012 . **“In Vitro Selection of Salt Tolerant Calli Lines and Regeneration of Salt Tolerant Plantlets in Mung Bean (*Vigna radiata* L. Wilczek)”**. Publisher online InTech. 250p.

Rasool S., Hameed A., Azooz M. M., Rehman M., Siddiqi T. O., and Ahmad P. 2013. "Salt Stress: Causes, Types and Response of Plants. In: Ecophysiology and Response of Plants Under Salt Stress, (Eds.: P. Ahmad, M.M. Azooz and M.N.V. Prasad). **Springer LLC, New York. pp. 1-24.**

Rattana, K. and S. Bunnag. 2015. "Differential Salinity Tolerance in Calli and Shoots of Four Rice Cultivars". **Asian Journal of Crop Science. 7 (1): 48 – 60.**

Rohanipoor, Ali *et al.* 2013. "Effect of Silicon on Some Physiological Properties of Maize (*Zea mays*) Under Salt Stress". **J. Biol. Environ. Sci., 7 (20), 71-79.**

Rubatzky, V.E. dan Yamaguchi, M. 1998. "**Sayuran Dunia 2 Prinsip, Produksi, dan Gizi**". Bandung: ITB Press.

Rukmana, R. 2009. **Usaha Tani Jagung**. Jakarta: Kanisius.

Ruwaida, I. P., Yuniastuti E., Supriyadi. 2009. "Variability analysis of Sukun durian plant (*Durio zibethinus*) based on RAPD marker". **Bioteknologi 6: 89-98.**

Saleh, B. 2012. Effect of Salt Stress on Growth and Chlorophyll Content of Some Cultivated Cotton Varieties Grown in Syria. **Communications in soil science and plant analysis 43: 1976-1983.**

Samantha, G. 2013. **Terbaru: Panjang Garis Pantai Indonesia Capai 99.000 Kilometer.** <<http://nationalgeographic.co.id>> [19 November 2015].

Santoso, U & F. Nursandi. 2003. "**Kultur Jaringan Tanaman**". Malang: Pusbitan UMM.

Santoso, U. dan Nursandi, F. 2004. "**Kultur Jaringan Tanaman**". Penerbit UMM Press, Malang.

Saputro, T.B. 2012. Multiplikasi Tunas pada Mikropropagasi Tanaman Transgenik Anggrek *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume Pembawa 35S: KNAT1 pada Media Tanpa Fitohormon. **Tesis**. Yogyakarta: Program Studi Bioteknologi. Universitas Gadjah Mada.

Scragg, A.H. 1997. "The Production of Aromas by Plant Cell Culture". **Adv. Biochem. Eng. Biotech.** **55**: 259 – 263.

Sembiring, I. M. S., Lollie A. P. Putri, dan Hot Setiado. "Aplikasi Penanda Lima Primer RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*) untuk Analisis Keragaman Genetik Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC) Sumatera Utara". **Jurnal Agroekoteknologi** . Vol.4. No.1, (566) :1748 – 1755.

Serraj R., and Sinclair T. R. 2002. "Osmolyte Accumulation: Can It Really Help Increase Crop Yield Under Drought Conditions?". **Plant Cell Environ** **25**: 333–341.

Sevengor, S., Yasar, F., Kusvuran, S., dan Ellialtioglu, S. 2011. "The Effect of Salt on Growth, Chlorophyll Content, Lipid Peroxidation and Antioxidative Enzymes of Pumkin Seedling". **African Journal of Agriculture Research**. Vol. 6 (21), pp. 4920-4924.

Shrivastava, Pooja, and Rajesh Kumar. 2015. "Soil Salinity: A Serious Environmental Issue and Plant Growth Promoting Bacteria As One of The Tools for Its Alleviation". **Saudi Journal of Biological Sciences** , **22**, 123–131.

Singh, K. N., and Chatrath, R., 2001. "Salinity Tolerance. In: Reynolds, M.P., Monasterio, J.I.O., McNab, A. (Eds.), **Application of Physiology in Wheat Breeding**. CIMMYT". Mexico: DF, pp. 101–110.

Stofberg, Sija F., Agata Klimkowska, Maurice P. C. P. Paulissen, Jan Philip M. Witte, Sjoerd E. A. T. M. Vander Zee. 2015.

“Effects of salinity on growth of plant species from terrestrializing fens”. **Aquatic Botany** **121**, 83–90.

Suarni dan Muh. Yasin. 2011. “Jagung sebagai Sumber Pangan Fungsional”. **Iptek Tanaman Pangan Vol. 6 No. 1**

Subandi, I. Manwan, and A. Blumenschein. 1988. **National Coordinated Research Program: Corn. Central Research Institute for Food Crops**. Bogor. p.83.

Subekti, N.A., Syafruddin., Efendi, R. dan Sunarti, S. 2008. **“Morfologi Tanaman dan Fase Pertumbuhan Jagung”**. Teknik Produksi dan Pengembangan. Maros: Balai Penelitian Tanaman Sereal.

Sudaryanto, T., R. Kustiari, dan H.P. Saliem. 2010. **“Perkiraan kebutuhan pangan tahun 2010–2050”**, hlm. 1 – 23 *dalam* Buku Analisis Sumber Daya Lahan Menuju Ketahanan Pangan Bekelanjutan. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. hlm. 163.

Sudharani, M. 2012. “Identification of SSR Markers for Testing of Hybridity and Seed Genetic Purity in Maize (*Zea Mays* L.)”. **International Journal of Science and Research (IJSR)**. ISSN (Online): 2319-7064.

Sugiyarto, Lili dan Paramita C. K. 2014. “Induksi Kalus Daun Binahong (*Anredera codifolia* L.) dalam Upaya Pengembangan Tanaman Obat Tradisional”. **J. Sains Dasar**. 3 (1) : 56 – 60.

Sujatmiko, B., Sulistyningsih, E. dan Murti, R.H. 2012. Studi Ketahanan Melon (*Cucumis melo* L.) Terhadap Layu Fusarium Secara *In Vitro* dan Kaitannya dengan Asam Salisilat. **Ilmu Pertanian**. Vol 15 No. 2, : 1-18.

Sunandar, D. dan Imron. 2010. “Optimalisasi Templat DNA Gen Genom Udang Galah, *Macrobrachium rosenbergii* dalam Proses

PCR – RAPD”. **Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur.**

Surahman, A., I. M. Wisnu dan Sasongko. 2008. **“Optimalisasi Embung dalam Pengembangan Usahatani Lahan Kering Di NTB (Kasus Desa Sukaraja, Kecamatan Jerowaru, Kabupaten Lombok Timur)”**. Nusa Tenggara Barat : Balai Pengkajian Teknologi Pertanian.

Suryanto, D. 2003. **“Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekuler”**. Universitas Sumatra Utara.

Suryowinoto, M. 2000. **“Pemuliaan Tanaman secara *In Vitro*”**. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.

Tangendjaja, B., Y. Yusdja dan N. Ilham. 2002. **“Analisis Ekonomi Permintaan Jagung untuk Pakan”**. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian.

Trimulyono, G., Solichatun, S. D. Marliana. 2004. “Pertumbuhan Kalus dan Kandungan Minyak Atsiri Nilam (*Pogostemon cablin* (Blanco) Bth.) dengan Perlakuan Asam  $\alpha$  - Naftalen Asetat (NAA) dan Kinetin”. **Biofarmasi** 2 (1): 9-14.

Tsuro, M et al. 1998. **“Comparative Effect of Different Types of Cytokinin for Shoot Formation and Plant Regeneration in Leaf-derived Callus of lavender. (*Lavandula vera* DC)”**. Laboratory of Plant Breeding Science,

Turan M. A, Elkarim A.H. A., Taban N., Taban S. 2010 “Effect of Salt Stress on Growth and Ion Distribution and Accumulation in Shoot and Root of Maize Plant”. **Afr J Agric Res** 5:584–588.

Tuteja, N. dan Mahajan, S. 2005. “Cold, Salinity and Drought Stresses: An overview”. **Arch. Biochem. Biophys.**, 444: 139-158.

Walton, N. J. *et al.* 1999. "Production of Secondary Metabolites in Cell and Differentiated Organ Culture in Wink, M (Ed.)". **Function of Plant Secondary Metabolites and Their Exploitation in Biotechnology Annual Plant Review 3: 311-335.**

Wardani, D. P., Solichatun, dan Setyawan, A. D. 2004. Pertumbuhan dan produksi saponin kultur kalus *talinum paniculatum* gaertn pada variasi penambahan asam 2,4-diklorofenoksi asetat (2,4-D) dan kinetin. **Biofarmasi. Vol. 2. No. 1, 35-43.**

Wijaya, C. H. 2002. "**Pangan fungsional dan kontribusinya bagi kesehatan**". Makalah ini disampaikan pada Seminar Online Kharisma ke- 2, Dengan Tema: Menjadi Ratu Dapur Profesional: Mengawal kesehatan keluarga melalui pemilihan dan pengolahan pangan yang tepat.

Winarso, B. 2012. Prospek dan Kendala Pengembangan Agribisnis Jagung di Propinsi Nusa Tenggara Barat. **Jurnal Penelitian Pertanian Terapan Vol. 12 (2): 103-114 ISSN 1410-5020.**

Wu, J., D. M. Seliskar and J. L. Gallager. 2005. "The Response Plasma Membrane Lipid Composition in Callus of The Halophyte *Spartina patens* (Poaceae) to Salinity". **Am. J. Bot. 92: 852 – 858.**

Yunita, R. *et al.* 2014. "Growth and Regeneration of Rice (*Oryza sativa* L.) Callus in Salt Medium". **Bioscience Research. 11(1): 04-09.**

Zubachtirodin, M.S. Pabbage, dan Subandi. 2007. "**Wilayah Produksi dan Potensi Pengembangan Jagung**". Jakarta: Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan, Departemen Pertanian. Hal 462-473.

## BIODATA PENULIS



Penulis bernama lengkap Siti Dianawati, biasa dipanggil Diana atau Dian. Penulis dilahirkan di Jember pada tanggal 22 Mei 1994 sebagai anak pertama, pasangan Moh. A'an Saputra dan Maskanah. Penulis diterima sebagai mahasiswa baru jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS) pada tahun 2012 melalui jalur tes tulis

SNMPTN 2012. Sebelumnya, penulis pernah menimba ilmu di SD Negeri 01 Karang Anyar, SMP Negeri 01 Ambulu dan SMA Negeri 1 Ambulu. Selama kuliah penulis menerima beasiswa BIDIKMISI, menjadi asisten laboratorium pada mata kuliah Perkembangan Tumbuhan, serta aktif dalam organisasi kemahasiswaan BEM ITS dimulai dari menjadi staff Project Management Badan Semi Otonom ITS Education Care Center (BSO IECC) BEM ITS periode 2013 – 2014 dan Manager Project Management BSO IECC BEM ITS periode 2014 – 2015. Penulis juga aktif dalam berbagai kegiatan kepanitiaan BEM ITS dan Himpunana Mahasiswa Jurusan Biologi ITS (HIMABITS) diantaranya yaitu, sebagai pengajar dalam program ITS Mengajar for Indonesia (IFI) tahun 2013, Bendahara program IFI 2014, ketua pelaksana program Surabaya Goes to School (SGTS) tahun 2014, sekretaris program Education for Educator tahun 2014, bendahara program Surabaya Education Great Event (SEGE) tahun 2014, Steering Committee (SC) Biological Opus Fair VII (BOF VII) tahun 2014 dan koordinator sub event BOF VIII tahun



2015. Selain itu, penulis juga aktif mengikuti beberapa pelatihan, yaitu ESQ (Emotion Spiritual Quotion) tahun 2012, Pra LKMM TD (Latihan Kepemimpinan Manajemen Mahasiswa Tingkat Dasar) tahun 2012, LKMM TD tahun 2013, PSI (Program Studi Islam) tahun 2012 dan PENDAKI (Pelatihan Dasar Islam) tahun 2012. Penulis dapat dihubungi untuk keperluan penelitian di alamat email sitidianawati @gmail.com.